Aus dem
Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
Direktor:
Prof. Dr. Herbert Theodor Brüster

HLA-DR-Antikörper
Suche und Identifizierung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Peter Alexander Fricke

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0052

Aus dem
Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
Direktor:
Prof. Dr. Herbert Theodor Brüster

HLA-DR-Antikörper
Suche und Identifizierung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Peter Alexander Fricke
1982

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. Brüster

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Grabensee

Inhaltsverzeichnis

I	Geschichtlicher Rückblick	1
II	Klinische Bedeutung des HLA-Systems	8
III	Material und Methoden	20
	Lymphozytenpräparation	20
	Typisierungstests für Zellen	21
	Serologischer Test	22
	Methoden zur Trennung von B- und T-Lymphozyten	25
	Antiseren für HLA-DR-Typisierungen	30
	Typisierungsmethoden ohne Trennung von B- und T-Lymphozyten	35
IV	Der HLA-DR-Genort	38
	Eigenschaften der HLA-DR-Antigene	44
	Heutiger Stand der Forschung	50
	Probleme und Schwierigkeiten bei der HLA-Typisierung	52
V	Fragestellung / Problem	60
VI	Methodik	61
	Prinzip	61
	Beschreibung	62
	a) B-Zell-Präparation	62
	Lymphozyten-Isolierung	62

	Präparation der Schaf-Erythrozyten (SRBC)	65
	B-Präparation (Rosettierung)	67
	b) Aufbereitung der Testseren	70
	Thrombozytenpräparation	70
	Absorption der HLA-A, -B, -C -Antikörper	71
	c) Test	72
	d) Kontrollen	74
	Phagozytose-Test	74
	Kontrollseren	74
	Immunfluoreszenz	75
	Diskussion der Methode	76
VII	Suche nach DR/DRw-spezifischen Antiseren	77
	Auswahl der Seren	77
	Screening	77
	Zellaustausch	78
VIII	Statistische Ausarbeitung	79
	Statistik	79
	MB und MT	81
	Ergebnis	81
	Diskussion der Auswertung der Seren	83
IX	Literaturverzeichnis	87

Abbildungen / Tabellen:

Abbildung 1: Lokalisation der HLA-Gene 39

Abbildung 2: HLA-Antigene 43

Abbildung 3: T-Lymphozyten/NSRBC-Rosetten 68

Tabelle A: HLA-DR/DRw-Antikörperhaltige Seren 85

Tabelle B: Seren ohne signifikante Korrelation 86

Geschichtlicher Rückblick

Der Nobelpreis für Medizin oder Physiologie wurde 1980 für Forschungen auf dem Gebiet des HLA-Systems an Jean DAUSSET, George SNELL und Baruj BENACERRAF vergeben. Damit erreichte eine Entwicklung einen vorläufigen Höhepunkt, die vor knapp 30 Jahren begonnen hatte (71).

Im Jahre 1952 erhielt DAUSSET mittels eines Leukozyten-Agglutinations-Tests die ersten Hinweise auf die Existenz eines Immunabwehr-Systems. Mit gezielten Forschungen konnte er schließlich 1958 das erste Lymphozyten-Antigen "Mac", heute HLA-A 2, nachweisen.

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Testmöglichkeiten zur Entdeckung der Antigene dieses HL- (Human Lymphocyte Antigen) - Systems entwickelt, so 1963 die Gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC oder MLR) durch [illegible] et al. (49) und 1964 durch TERASAKI et al. der Lymphozytotoxische Mikrotest (112). Bei der MLC wird die Tatsache

ausgenutzt, daß gemischte Lymphozyten-Suspensionen zweier nicht verwandter Individuen sich in der Gewebekultur gegenseitig so stimulieren, daß sie sich zu Lymphoblasten weiterentwickeln. Im Lymphozytotoxischen Mikrotest reagieren Lymphozyten mit gegen sie gerichteten Antikörpern, was zur Zytolyse führt. Diese beiden Basistests wurden mit der Zeit immer weiter verändert und verbessert, so entwickelte sich aus der MLC schließlich 1973 der HTC (Homocygote Typing Cells) - Test, wobei durch die Verwendung von homozygoten Zellen die Bestimmung der Antigen-Determinanten vereinfacht wurde, und 1975 der PLT (Primed Lymphocyte Typing) - Test, bei dem die Typisierungszellen durch eine Vorbehandlung für ein bestimmtes Antigen sensibilisiert wurden. Mit diesen Tests konnten die Immun-Antigene noch genauer und differenzierter untersucht werden.

Parallel zur Entwicklung der Untersuchungsmethoden wurde auch die klinische Bedeutung des HLA-Systems immer deutlicher. Eine der ersten Beobachtungen war, daß das HLA-System großen Einfluß auf die Abstoßungsreaktion nach Transplantationen ausübt. Es hatte sich gezeigt, daß bei einer Übereinstimmung

der HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger eines Transplantats die Überlebensrate länger war als bei Nicht-Übereinstimmung (73).
Die Hauptschwierigkeit bestand in dem großen Polymorphismus dieses Systems, so daß die Auswahl geeigneter Spender ein großes Problem darstellte.

Aus diesem Grunde rief VAN ROOD 1967 "Eurotransplant" ins Leben, eine Organisation, die die Zusammenarbeit der einzelnen Transplantationszentren koordinieren sollte, um die Übereinstimmung zwischen Transplantat-Spender und -Empfänger im HLA-System zu optimieren und so insgesamt bessere Ergebnisse zu erzielen.

Bis 1970 waren drei HLA-Gene entdeckt worden, deren Produkte zum Teil nicht nur auf Leukozyten, sondern auch auf anderen Körperzellen, wie Epidermiszellen, Spermatozoen, Fibroblasten, Endothelialzellen und Thrombozyten vorhanden sind (1, 17).

Die Tatsache, daß Thrombozyten HLA-A, -B, -C -Antigene tragen, wird ausgenutzt, um in HLA-antikörperhaltigen Testseren diese HLA-A, -B, -C -Antikörper durch Thrombozyten zu binden und dann zusammen mit den Thrombozyten aus dem Serum zu eliminieren. Das führte zur Entdeckung des vierten Genortes, HLA-D, dessen Produkte offensichtlich auf Thrombozyten nicht ausgedrückt sind (60).

Zur Typisierung des HLA-D wurde die MLC, die ein Ausschlußtest ist, da sie nur anzeigt, ob zwischen den beiden Zellpopulationen Unterschiede bestehen oder nicht, so verfeinert (HTC, PLT), daß auch eine direkte, positive Typisierung möglich wurde. Dennoch bestand der große Nachteil, daß jede Zellkultur über mehrere Tage inkubiert werden mußte und der Test somit sehr zeitaufwendig war (70).

Die HLA-D-Antigene waren damit z e l l u l ä r definiert worden, während die HLA-A, -B, -C -Antigene auch s e r o l o g i s c h nachgewiesen werden konnten.

VAN LEEUWEN et al. versuchten deshalb 1973 die mittels MLC gefundenen HLA-D-Antigene auch serologisch zu definieren. Dazu wurden Seren verwendet, die die MLC blockieren konnten, die also offensichtlich Antikörper enthielten, die mit den entsprechenden Antigenen reagierten. Vergleichende Untersuchungen zeigten aber, daß die serologischen Tests nicht zu völlig gleichen Ergebnissen führten wie die zellulären Tests. Deshalb wurden die serologisch definierten Antigene mit DR (D related) bezeichnet. Diese Antigene wurden nur auf ca. 15 - 25 % der Lymphozyten gefunden, dieser Prozentsatz entspricht dem Anteil der B-Lymphozyten an den gesamten, im peripheren Blut vorkommenden Lymphozyten, so daß die Vermutung nahelag, daß die DR-Antigene ausschließlich auf B-Lymphozyten vorkommen (1, 60, 99, 100, 113). Hierfür spricht auch die Erkenntnis, daß B-Zellen bessere Stimulatoren und Responder in der MLC als Gesamt-Lymphozyten (PBL) sind (111).

So wurde 1975 auf dem 6. Internationalen HLA-Workshop in Arhus die Entscheidung getroffen, die

B-Zell-Serologie zum Hauptthema des 7. Internationalen Workshops zu machen. Die antikörperhaltigen Seren, die mit einem Teil der Lymphozyten reagierten und MLC-Reaktionen blockieren konnten, deuteten schon jetzt auf eine Analogie zum Immunsystem der Maus hin, bei der ähnliche Entdeckungen gemacht worden waren (19).

Die Thematiken der verschiedenen Internationalen Workshops machen das wachsende Interesse an der DR-Serologie (53) deutlich:
Während auf dem ersten Workshop 1964 vor allem Reagenzien ausgetauscht wurden, wurde auf dem zweiten und dritten 1965 und 1967 das erste Antigen definiert. Auf dem vierten und fünften 1970 und 1972 wurde festgestellt, daß das HLA-System von zwei verbundenen Loci (HLA-A und -B) als universelles genetisches Modell kontrolliert wird und die allgemeine Verteilung der Antigene in verschiedenen Populationen aufgezeigt. 1975 wurde auf dem 6. Workshop neben der serologischen Definition des HLA-C das HLA-D eingeführt, definiert durch die zelluläre Reaktion der MLC. Das Thema

des 7. Workshop 1977 war die serologische Definition von HLA-DR-Antigenen sowie die Beziehung des HLA-DR-Genortes zum zellulär definierten HLA-D-Genort und seine Bedeutung in der Krankheitsassoziation (22). Hier wurden 8 DR-Spezifitäten definiert. Dabei wurde die Annahme der Existenz eines 2. Genlocus nicht als nötig erachtet (125), jedoch ist diese Meinung heute überholt. Der 8. Workshop 1980 in Los Angeles schloß eine prospektive Studie für HLA-DR-Typisierungen bei Leichennieren - Transplantationen ein (27, 87). Hier war das wichtigste Resultat die verbesserte Qualität der B-Zell-DR-Serologie. Die Spezifitäten DR 1, DR 2, DR 3, DR 4, DR 5, DR 7 wurden eindeutig, die Spezifitäten DRw 8, DRw 9, DRw 10 provisorisch definiert.

Klinische Bedeutung des HLA-Systems

Parallel zur Entwicklung der Typisierungsmethoden haben sich auch weitere Anwendungsgebiete in der klinischen Medizin für HLA-Typisierungen aufgetan. Das Immunsystem spielt in einem Individuum bei allen Kontakten mit körperfremden Substanzen (Selbst/Nicht-Selbst) eine entscheidende Rolle. Hieraus erklärt sich auch die hauptsächlich klinische Anwendung der HLA-Typisierung, nämlich bei Transplantationen vor allem von Nieren, aber auch von Knochenmark (40), Cornea, Haut und Herz. Außerdem werden Spender und Empfänger von Granulozyten- und Thrombozyten-Transfusionen typisiert. Weiterhin ergibt sich, wie bei allen genetisch erforschten Systemen, eine Möglichkeit des Einsatzes in der Vaterschaftsbestimmung.

Auch wurde seit 1972, als FALCHUK et al. eine Assoziation zwischen Zöliakie und HLA-B 8 feststellten, die Verbindung zwischen den HLA-Genen und bestimmten Krankheiten weiter erforscht. Die meisten dieser Krankheiten sind relativ seltene,

chronische Krankheiten, wie beispielsweise M. Bechterew, Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Juveniler Diabetes Mellitus, Dermatitis Herpetiformis, Chronische Hepatitis, Sjögren/ Sicca-Syndrom, M. Addison, M. Basedow und verschiedene Tumoren (13, 84, 116).

ALBERT und GÖTZE (1) faßten 1977 zusammen, daß die meisten bekannten Beziehungen zwischen HLA und Krankheiten sich auf den B-Locus beziehen. Sie vermuteten, daß die Gene, die diese Krankheiten auslösen, nahe dem B-Locus liegen, einige Krankheiten sind allerdings noch enger mit dem HLA-D-Locus assoziiert. Somit könnten weitere Beziehungen zwischen HLA und Krankheiten aufgeklärt werden, wenn die HLA-D-Testung weiter fortschreitet. 1978 stellten BODMER und BODMER fest (23), daß jedoch auch in Beziehung auf HLA und Krankheiten die B-Lymphozyten-Serologie noch nicht so ausgereift ist, daß immer eindeutige Ergebnisse erzielt werden können und daß diese Typisierungsmethode deshalb noch weiterentwickelt werden muß.

Im gleichen Jahr führte OLIVER (84) aus, daß vom klinischen Standpunkt aus die HLA-Typisierung noch keinen diagnostischen Wert hat, jedoch bei der Differenzierung von Untergruppen von Krankheiten (z.B. Diabetes Mellitus, Myasthenia Gravis) helfen kann.

Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen HLA und Krankheiten hat GRUMET 1977 (43) gegeben:
Ein HLA-Antigen könne als Marker für Krankheits-Empfänglichkeit dienen, weil sich dieses im Kopplungs-Ungleichgewicht (linkage disequilibrium) mit einem Immunantwort-Gen befindet, das für die Krankheit von Bedeutung ist. Ebenso ist es möglich, daß ein HLA-Antigen als Marker für spezifische Gene dient, die die Schwäche von bestimmten normalen Proteinen (z.B. Komplement) begründen.

Das wichtigste klinische Anwendungsgebiet für HLA-Typisierungen liegt heute bei Nieren-Transplantationen, hierbei ist jedoch zwischen

den sogenannten Lebend-Transplantationen von Nieren, wobei Spender und Empfänger verwandt sind und den Transplantationen von Leichen-Nieren zu unterscheiden. CARPENTER stellte 1980 fest, daß die Typisierung der Leukozyten-Antigene des HLA-Systems von fragloser Wichtigkeit für die Überlebensrate von Nieren-Allotransplantaten von lebenden verwandten Spendern ist. Er begründet es damit, daß Geschwister, wenn sie in den HLA-A, -B, -C -Genen übereinstimmen, aufgrund des hohen Kopplungs-Ungleichgewichtes höchstwahrscheinlich auch auf dem noch nicht typisierten D-Locus, der wahrscheinlich die verantwortlichen Antigene für die Stimulation der proliferativen Antwort kodiert, identische Gene tragen. Die Daten des 8. Workshop über die DR-Typisierung bei Lebend-Nieren-Transplantationen unterstützten die These, daß HLA-D/DR wichtig bei der Abstoßungsreaktion sei (27).

Der voraussagbare Wert bei Leichennieren-Transplantationen ist dagegen in den letzten 10 Jahren sehr häufig diskutiert worden (27).

Schon 1977 konnten SOLHEIM et al. in einer norwegischen Patientengruppe mittels MLC-Typisierungen zeigen, daß die größere Bedeutung für die Überlebensrate nach Nierentransplantationen den HLA-D-Determinanten zukommt, während HLA-A, -B -Typisierungen nur untergeordnete Bedeutung haben, auch zusätzliche HLA-C-Übereinstimmungen konnten die Überlebensrate nicht erhöhen (104).

MORRIS et al. (74) betrachteten 1978 es noch als "wishful thinking", wenn allein die HLA-DR-Antigene eine Verbesserung der Ergebnisse bei Leichennieren-Transplantationen erzielen lassen würden; dieses würde die HLA-Typisierung bei Nierentransplantationen sehr vereinfachen. Sie warfen auch die Frage auf, ob nur ein einziger Locus der HLA-Region für den Effekt der Kompatibilität verantwortlich sei oder mehrere.

TING und MORRIS stellten noch im selben Jahr fest, daß die serologische Typisierung für die HLA-DR-Antigene noch keine Aussagekraft für den Erfolg bei Leichennieren-Transplantationen hat, sie fanden lediglich einen allerdings nicht signi-

fikant besseren Transplantationserfolg bei HLA-DR-Übereinstimmung. 1979 konnten sie dann bei 112 Leichennieren-Transplantationen nach HLA-A, -B und HLA-DRw- 1 - 7 -Typisierungen und einer Erfolgsbeurteilung nach 3 Monaten definitiv zeigen, daß die Typisierung für die DR-Antigene den Transplantationserfolg erhöht (119, 121). Gleiches wiesen auch CROSS et al. im selben Jahr in einer Serie von 36 Leichennieren-Transplantationen nach (29).

1978 hatte PERSIJN (94) an 79 Eurotransplant-Patienten, die eine Leichenniere erhalten hatten, gezeigt, daß die höchste Überlebensrate zu erzielen war, wenn ein oder zwei DR-Antigene und drei oder vier A,B-Antigene identisch waren. Er testete mit gefrorenen Milz-Lymphozyten und frischen peripheren Blut-Lymphozyten (peripheral blood lymphocytes, PBL). Bis auf zwei Transplantat-Empfänger hatten alle vorher Transfusionen erhalten oder waren schwanger gewesen. Schon 1977 (93) hatte er beschrieben, daß eine Bluttransfusion die Transplantat-Überlebensrate drastisch verbesserte.

Er schloß hieraus, daß ein weiteres, nicht dem HLA angegliedertes System hierbei einen Einfluß hat. Daß transfundierte Patienten eine höhere Transplantat-Überlebensrate haben als nicht-transfundierte, ist heute unbestritten.

Zwei solche, dem HLA verwandte Systeme (MB und MT) wurden mittlerweile entdeckt (35, 92). Ob diese Systeme nur Über-/Untergruppen des HLA-D/DR-Systems oder ob sie unabhängige Systeme sind, ist bis heute nicht geklärt (91, 115). MÜLLER et al. zeigten im Oktober 1981 auf, daß mit den MT-Spezifitäten möglicherweise Antigene erfaßt werden, die für die Transplantationen und das Angehen eines Organs von wesentlicher Bedeutung sind. Die von ihnen untersuchten und typisierten 20 MT-identischen Organe erreichten eine 2-Jahres-Überlebensrate von 95 % (77).

Weitere Einflüsse haben die Blutgruppe und das Geschlecht der Patienten (33, 62, 86) sowie Rassenunterschiede, die rassenspezifische Antigene oder Unterschiede im Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium) zwischen HLA-A, -B -Antigenen und

anderen Transplantations-Antigenen in der HLA-Region bedingen (54). Als Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium) wird der Unterschied zwischen der erwarteten und der beobachteten Häufigkeit von bestimmten HLA-A und -B -Kombinationen bezeichnet (17). Schließlich sei noch der von OPELZ und TERASAKI (86) erwähnte Einfluß der transplantierenden Klinik angeführt. In dem Bestreben, möglichst das Transplantationsergebnis voraussagen zu können, wurden viele der Patienten vor und nach der Transplantation auf zirkulierende Antikörper untersucht (120). Schon OPELZ, MICKEY und TERASAKI (85) wiesen 1972 darauf hin, daß die Überlebensrate nach Leichennieren-Transplantationen signifikant höher ist bei den Patienten, die schon während der Zeit der Hämodialyse auf HLA-inkompatible Bluttransfusionen für lange Zeit keine Antikörper entwickelt haben.

In Hinblick auf die Aussagekraft auftretender Anti-B-Zell-Antikörper für die Transplantat-Überlebensrate sind die Meinungen geteilt. HARDY et al. (44) zeigten 1979, daß die humorale

Abstoßung vom akuten und chronischen Typ von der Entwicklung von Anti-B-Zell-Antikörpern (=Anti - DR - Antikörper) begleitet wird. Mit fortschreitender Abstoßung wurden multispezifische Anti-B-Zell-Antikörper gefunden. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten DE MOUZON et al. (76) 1979, als sie die Beziehung zwischen Anti-Spender-HLA-DR-Lymphozyten und Anti-IgG in Relation zu ihrem Verhalten während des klinischen Verlaufs und die möglichen synergistischen oder unabhängigen Rollen bei der Abstoßung untersuchten. Sie fanden, daß der Anti-IgG-Serumspiegel mit der Abstoßung korrelliert war und daß das Auftreten von Anti-Spender-HLA-DR-B-Lymphozyten definitive Abstoßung anzeigte.

Dagegen beschrieben LUCIANI et al. im gleichen Jahr nach Untersuchung von 69 Transplantationen, daß Anti-B-Lymphozyten-Antikörper, die durch den Standard-Mikrozytotoxizitäts-Test entdeckt wurden, die Überlebensrate weder verlängern noch verkürzen. Dies galt sowohl für Leichennieren als auch für Lebend-Transplantate von verwandten Spendern (64).

TERASAKI et al. fanden Unterschiede zwischen B-Zell-Kälte-Antikörpern und B-Zell-Wärme-Antikörpern. Sie zeigten, daß Patienten mit B-Zell-Kälte-Antikörpern (Auto-Antikörper) eine höhere Transplantat-Überlebensrate hatten als Patienten mit B-Zell-Wärme-Antikörpern (Allogenetische Antikörper). Sie vermuteten, daß die Wärme-Ia-Antikörper zerstörend wirken, während die Kälte-Antikörper bei Transplantationen nicht relevant sind (114). Diese scheinen auch heute noch mit günstiger Transplantat-Prognose assoziiert zu sein (62).

DOKIADIS et al. untersuchten die lymphozytotoxische Aktivität von HCl-Glycin-Eluaten aus abgestoßenen Leichennieren-Transplantaten. Sie interpretierten im Oktober 1981 ihre Ergebnisse unter der Annahme, daß die hier eluierten Antikörper die für die Organabstoßung relevanten sind, wie folgt:
Sie stellten fest, daß neben den erwarteten HLA-A, -B, -C -Antikörpern auch B-Zell-spezifische (HLA-DR) -Antikörper und Antikörper gegen die auf Thrombozyten und Erythrozyten ausgedrückten

Nicht-HLA-Determinanten (Lewis?) allein für eine irreversible Organschädigung verantwortlich zu machen sind (33).

Zum gleichen Zeitpunkt zeigten NEUHAUS et al., daß bis zu einem gewissen Grade das Schicksal eines Transplantates durch den Vergleich der MLC-Reaktivität zwischen Spender und Empfänger vor und nach einer Bluttransfusion vorausgesagt werden kann:
Ein Anstieg der MLC-Reaktion spricht für kürzere, ein Abfall für relativ lange Überlebenszeiten (83).

In den späten sechziger Jahren wurde entdeckt, daß ein positiver HLA-A, -B, -C -Crossmatch zwischen Empfänger-Serum und Spender-Lymphozyten eine hyperakute Abstoßung bedeutet. Ein positiver T-Zell-Zytotoxizitäts-Crossmatch gilt auch heute nach wie vor als Kontraindikation einer Transplantation (62), allerdings können jetzt auch Patienten transplantiert werden, die nur einen positiven B-Zell-Crossmatch haben (75, 118).

D'APICE und TAIT konnten sogar zeigen, daß ein positiver B-Zell-Crossmatch mit verbesserter Transplantat-Überlebensrate assoziiert war. Aufgrund ihrer Ergebnisse postulierten sie aber, daß die meisten positiven B-Zell-Crossmatches in ihrer Studie nicht durch Anti-HLA-DR-Antikörper bedingt sind (7).

Material und Methoden

Lymphozytenpräparation

Um aus dem peripheren Blut eine Lymphozyten-Suspension zu isolieren, wird heute allgemein heparinisiertes Blut nach Verdünnung über einem Dichte-Gradienten (Lymphoprep^{R}, Ficoll-Isopaque) zentrifugiert, so daß die Gesamt-Lymphozyten (PBL) als Band in der Interphase erscheinen und nach mehrmaligem Waschen und Einstellen auf eine Standard-Konzentration weiter verwendet werden können. Hierbei sollten sie in einem Nährmedium (z.B. Hank's Lösung, RPMI 1640, McCoy's 5a) gehalten werden. Sie lassen sich unter bestimmten Bedingungen auch einfrieren, um dann erst nach längerer Zeit typisiert zu werden.

Typisierungstests für Zellen

1963 wurde durch HIRSCHHORN et al. als zellulärer Typisierungstest für Lymphozyten-Antigene die Gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC) entwickelt. Hierbei werden Lymphozyten zweier Individuen miteinander gezüchtet, wobei sie sich zu Lymphoblasten weiterentwickeln. Sie stimulieren sich dabei gegenseitig. 1966 verbesserten BACH und VOGTMOW diesen Test, indem sie einen Lymphozytenstamm inaktivierten, so daß er sich nicht mehr stimulieren ließ, wohl aber selbst stimulierte (one way stimulation). MEMPEL et al. verfeinerten diesen Test 1973, indem sie homozygote Typisierungszellen verwendeten, mit denen jetzt eine direkte Determinanten-Testung möglich war (HTC). Schließlich wurde 1975 der Test von SHELHY et al. so weiterentwickelt, daß in einer Vorinkubation spezifisch geprägte T-Lymphozyten gezüchtet wurden (PLT), (17, 49).
Allen diesen Tests haftet jedoch der Nachteil ihrer mehrtägigen Dauer an (1, 70).

Serologischer Test

1964 hatten TERASAKI und McCLELLAND einen Mikro-Lymphozytotoxizitäts-Test entwickelt, um menschliche Leukozytengruppen serologisch zu definieren. Sie isolierten die Leukozyten durch Zentrifugation von heparinisiertem Blut in Kapillar-Röhrchen und inkubierten sie in einer Plastik-Petrischale zusammen mit frischem AB-Serum. Dies bewirkte eine Adhäsion von Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten, was unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Somit blieben die nichtadhärenten Lymphozyten übrig. Kontaminierende Erythrozyten wurden entweder durch weitere Zentrifugation in Kapillar-Röhrchen oder durch Lysis mit hypotonen Lösungen entfernt.

Die Testung erfolgte in kleinen Ölkammern, in die die Lymphozyten-Suspension, Antiserum-Verdünnungen (z.T. von Schwangeren) und Kaninchen-Komplement eingespritzt wurden. Darauf folgte eine vierstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Sodann wurde das Ergebnis im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop

abgelesen. Das Kriterium für den Zelltod war, daß der Zellkern sichtbar wurde.

Die Autoren gaben damals als Vorteile an, daß der Test reproduzierbar, schnell und extrem sensibel sei (112).

Dieser ursprüngliche Test ist im Laufe der Zeit immer weiter verbessert worden. So wird heute der Zelltod durch das Eindringen von Farbstoff (z.B. Eosin, Trypan-Blau) durch die geschädigte Zellmembran und durch den Verlust der Doppelbrechung im Phasenkontrast-Mikroskop angezeigt. Außerdem, wie oben erwähnt, ist die Lymphozyten-Präparation vereinfacht und verbessert worden.

Dennoch ist das Prinzip dieses Tests, die zu typisierenden Lymphozyten mit Antiserum und Komplement unter Öl miteinander reagieren zu lassen, bis heute so gut wie unverändert geblieben; der Test ist heute zu einer Standard-Typisierungs-Methode geworden.

1979 beschrieben INDIVERI et al. (48) einen weiteren Test. Er basiert auf der Reaktion mit Schaf-Erythrozyten, die mit gereinigten Antikörpern gegen Kaninchen-IgG und menschliches IgG beladen sind. Er soll zehnfach empfindlicher als der Mikro-Zytotoxizitäts-Test sein und entdeckt sowohl komplementfixierende und auch nicht-komplementfixierende Antikörper. Die Autoren schlugen ihn als eine Ergänzung zum herkömmlichen Mikrozytotoxizitäts-Test vor, um auch niedrige Antikörper-Konzentrationen zu entdecken.

Methoden zur Trennung von B- und T-Lymphozyten

Eine der heute gebräuchlichen Methoden zur Trennung von B- und T-Lymphozyten ist das Rosettieren mit Schaf-Erythrozyten (Sheep Red Blood Cells, SRBC). Man macht sich dabei die Eigenschaft zunutze, daß menschliche T-Lymphozyten in der Lage sind, Schaf-Erythrozyten an ihrer Oberfläche zu fixieren und somit eine Rosette zu bilden. Dazu wird die aus B- und T-Lymphozyten bestehende Suspension einer zu typisierenden Person mit gewaschenen Schaf-Erythrozyten inkubiert. Die hierbei entstehenden T-Rosetten (T-Lymphozyten mit Erythrozyten) können nun von den nicht reagierenden B-Lymphozyten durch Zentrifugation über einem Dichte-Gradienten isoliert werden. Die B-Zellen bleiben somit in der Interphase. Um die Ergebnisse hierbei noch zu verbessern, können die gewaschenen Schaf-Erythrozyten vor der Inkubation auch mit Neuraminidase, Papain, Bromelin oder AET (2-Amino-Ethyl-Isothiouronium Bromide Hydrobromide) behandelt werden, die so erhaltenen Rosetten sind dann mechanisch stabiler und es können Anreicherungen bis über 90 % erzielt werden (3, 66, 69, 114).

Außerdem wird die Inkubation der Lymphozyten-Suspension mit den vorbehandelten Schaf-Erythrozyten direkt über dem Dichte-Gradienten durchgeführt, um die gebildeten Rosetten nicht durch mechanische Irritation bei der Überführung zum Teil zu zerstören. Dies führt zu einer höheren B-Zell-Ausbeute mit größerer Reinheit (89). Ein Nachteil dieser Methode der B-Lymphozyten-Anreicherung kann sein, daß hier eine Negativ-Auslese der B-Zeller durch T-Rosetten erfolgt, dadurch können Zellen mit fehlenden Oberflächen-Antigenen die B-Zell-Suspension kontaminieren (108).

Um dieses auszuschalten, beschrieben 1979 STOCKER et al. eine Technik, um HLA-DR-Antigen tragende Zellen anzureichern. Dabei reagiert ein monoklonaler Mäuse-Antikörper mit HLA-D-Strukturen. Die hiermit beladenen Zellen können nach Rosettierung mit Anti-Mäuse-Immunglobulin beladenen Rinder-Erythrozyten separiert werden. Später werden die Erythrozyten lysiert, die an den Lymphozyten anhängenden Erythrozyten-Zellwand-Reste störten die

spätere Typisierung nicht. Nach der Lysis waren noch 90 - 95 % der Leukozyten lebend. Der Vorteil dieser Methode:
Es erfolgt eine positive Selektion für HLA-DR-Antigen tragende Zellen. Die Autoren stellten fest, daß bei einigen Zellen nur mit dieser Methode HLA-DR-Antigene zu entdecken waren (108).

Um die Nachteile des Rosettierens mit Tier-Erythrozyten zu umgehen, wurde von einigen Autoren die Tatsache ausgenutzt, daß B-Zellen an Glas-Oberflächen adhärent sind (45, 51, 81).

ALBRECHTSEN et al. stellten 1978 noch eine Kontamination von ca. 30 % Makrophagen in der B-Zell-angereicherten Suspension nach Rosettierung mit Schaf-Erythrozyten fest, die sie durch Inkubation an Plastik-Oberflächen entfernten (3).
DANILOVS et al. beschrieben auf dem 8. Workshop eine ähnliche, vereinfachte Methode, bei der die Gesamtlymphozyten (PBL) in Nährmedium in einer mit Nylonwatte gefüllten Säule (Plastik-Strohhalm) inkubiert werden. Sodann werden alle nicht adhärenten Zellen eluiert und zum Schluß die an der Nylonwatte

angelagerten B-Lymphozyten durch manuelles Auspressen gewonnen (31).

Auf dem "HLA-DR Intertransplant Workshop 79" wurde noch als Kriterium für die weitere Verwendung von B-Lymphozyten-angereicherten Suspensionen nach der Trennung ein Mindestgehalt von 60 % B-Zellen und ein Höchstanteil von 30 % T-Zellen gefordert (95), also ein relativ hoher Anteil von kontaminierenden Zellen (v.a. Monozyten) zugelassen. Im gleichen Jahr konnten MADSEN et al. (66) zeigen, daß die Monozyten-Kontamination schon in der Gesamt-Lymphozyten-Suspension nach Trennung von den übrigen Blutbestandteilen mittels Lymphoprep^{R} als Dichtegradient nur bei ca. 3 % liegt.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch DE GOEY et al. ein Jahr später (41). Sie benutzten eine Methode, bei der die B-Lymphozyten-Anreicherung durch Inkubation der Zellsuspension in Petrischalen bei 37^{o} C für 30 Minuten erreicht wurde. Dabei wurden die meisten T-Lymphozyten und nicht

lebenden B-Lymphozyten sowie Granulozyten und Erythrozyten durch Nicht-Adhäsion entfernt. Die adhärenten Zellpopulationen zeigten eine Kontamination von weniger als 10 % mit T-Lymphozyten und ca. 8 - 10 % Monozyten.

Eine weitere Methode zur Trennung von B- und T-Lymphozyten, die 1977 von McMICHAEL et al. beschrieben wurde, nutzt die Tatsache aus, daß menschliche T-Zellen negativer geladen sind als B-Lymphozyten. Sie setzten die Gesamt-Lymphozyten-Suspension für insgesamt 30 Minuten der Elektrophorese aus. Sie erzielten dabei ähnliche Ergebnisse wie mit der Schaf-Erythrozyten-Rosetten-Methode, wobei aber die Elektrophorese den Vorteil der schnelleren Durchführbarkeit (2 - 3 Std. gegenüber 6 Std.) mit sich bringt. Die Zellen waren nach dieser Prozedur nicht empfindlicher als unseparierte Zellen (72).
Schließlich sei noch erwähnt, daß der Anteil von B-Zellen in den PBL oft durch physische Aktivität vor Abnahme des Blutes erhöht wird (61).

Antiseren für HLA-DR-Typisierungen

Da die aus dem Menschen gewonnenen antikörperhaltigen Seren nicht nur HLA-DR-Antikörper, sondern auch HLA-A, -B, -C -Antikörper enthalten, müssen diese vor der DR-Typisierung aus dem Serum entfernt werden, da sonst die HLA-A, -B, -C -Reaktionen die interessierenden DR-Reaktionen überdecken würden.

1973 bemerkten VAN LEEUWEN et al. (60), daß Thrombozyten zwar HLA-A, -B, -C -Antigene, aber keine HLA-D-Antigene (Ia-Antigene) tragen. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um in antikörperhaltigen Seren, z.B. von Schwangeren, die vorhandenen HLA-A, -B, -C -Antikörper zu absorbieren, so daß nur noch die HLA-DR-Antikörper übrig bleiben.

Außer von Schwangeren ließen sich theoretisch Antiseren durch wiederholte Transfusionen von kleinen Mengen von Vollblut (1) oder durch Immunisation von Freiwilligen gewinnen, was aber in Deutschland aus ethischen Gründen nicht möglich ist (2).

Zur Absorption der HLA-A, -B, -C -Antikörper werden die Antiseren mit gemischten Thrombozytensuspensionen von 80 - 100 Personen inkubiert, so daß die dann gebundenen HLA-A, -B, -C -Antikörper mit den Thrombozyten abzentrifugiert werden können.

KÖHLER und MILSTEIN beschrieben 1975 Hybrid-Zellinien, die durch Fusion von Mäuse-Myelomzellen mit Mäuse-Milz-Zellen (Plasma-/B-Zellen) eines immunisierten Spenders durch das Sendai-Virus entstanden waren. Diese Hybridzellen vereinigten den Vorteil der Myelomzellen, auch in vitro zu wachsen, mit der Fähigkeit der Plasmazellen, spezifische Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu produzieren. Dieses erlaubt die permanente Produktion von spezifischen, gegen ein vorbestimmtes Antigen gerichteten Antikörpern in einer Gewebekultur (57, 58). In Zukunft ist dies eventuell auch mit menschlichen Zellen möglich.

Der Vorteil dieser Methode ist, daß die gewonnenen Antiseren monospezifisch und in großer Menge zu erhalten sind (37). Es könnte damit eine bessere

Aufschlüsselung der heute bekannten Spezifitäten sowie die Aufspaltung der Immunantwort in Unterschritte möglich sein.
Die Nachteile liegen jedoch, wie erst kürzlich während der 13. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Histokompatibilitätstestung in Hannover übereinstimmend ausgedrückt wurde, in den noch bestehenden technischen Schwierigkeiten (z.T. mangelndes Wachstum bei Monospezifität, fehlende Spezifität bei gutem Wachstum, Änderung der Spezifität während des Wachstums etc.) sowie in der Tatsache, daß die in vitro gehaltenen Zellen eine durchschnittliche Lebensdauer von nur 60 - 90 Tagen haben.
Insgesamt ist diese Methode noch nicht verläßlich, sie befindet sich noch im Versuchsstadium, so daß bis heute keine praktische Anwendung möglich ist. Auch in Zukunft wird sie nach der heute vorherrschenden Meinung die bisherigen Methoden nicht ersetzen können.

1978 zeigten SOLHEIM et al., daß Kaninchen immunisiert werden konnten, so daß sie Anti-D/DR-Seren synthetisierten, und BELVEDERE beschrieb 1980 sogar, daß die Produktion von Antikörpern gegen menschliche Allospezifitäten auch in phylogenetisch vom Menschen entfernten Spezien möglich sei (15, 16, 105).

Eine Methode, Nicht-DR-Antikörper in einem Serum ohne Thrombozytenabsorption zu unterdrücken, haben 1976 BERNOCO et al. beschrieben ("bb"-Test). Hierbei wurden Lymphozytensuspensionen mit Truthahn-Antihuman-Beta-2-m-Mikroglobulin vorbehandelt, um dann normal zytotoxisch getestet zu werden. Die Reaktionen von HLA-A, -B, -C -Antikörpern werden durch das Anti-β_2m verhindert, das auf dem entsprechenden Antigen fixiert ist. Teilweise zeigten die unabsorbierten Seren stärkere Reaktionen als thrombozytenabsorbierte Seren; in den Ergebnissen zeigten sie z.T. ausgezeichnete Übereinstimmung (13).

Ein ähnliches Anti-Human-Mikroglobulin läßt sich auch aus Kaninchen-Seren (Kaninchen-F(ab')$_2$) gewinnen (14).

Alle diese Tests sind nicht auf die Absorption der HLA-A, -B, -C -Antikörper durch Thrombozyten angewiesen. Nachteilig ist jedoch der große Aufwand dieser Methoden (14, 18, 30, 47).

Typisierungsmethoden ohne Trennung von B- und T-Lymphozyten

Unter besonderen Bedingungen kann die Trennung von B- und T-Lymphozyten entfallen, wie beispielsweise bei der Typisierung von Milz-Lymphozyten. Ebenso brauchen die Lymphozyten von Patienten mit lymphatischer Leukämie nicht separiert zu werden, da sie bis zu 90 % die Ia-Charakteristika der B-Lymphozyten tragen (20, 125).

Da die Typisierungen für HLA-DR-Antigene sich aber nicht auf diese Sonderfälle beschränken, wurden weitere Methoden entwickelt, um verläßliche Resultate ohne Trennungsprozedur zu erhalten.

Eine Methode, die schon 1971 von TAGASUKI und 1974 von MARTEL et al. beschrieben wurde, wurde durch VAN ROOD und VAN LEEUWEN 1976 wieder aufgegriffen. Sie färbten die B-Lymphozyten mit Fluoreszeinmarkiertem Anti-Human-IgG an und inkubierten dann die Zellsuspension mit B-Zell-Antiserum. Lysierte Zellen wurden mit rot fluoreszierendem Ethidiumbromid

angefärbt. Durch bestimmte Filtertechnik ließen sich rote und grüne B-Zellen zur gleichen Zeit ablesen.
Der Vorteil der gleichzeitigen Markierung besteht darin, daß Überlappungen der Subpopulationen direkt erkannt werden, außerdem läßt sich der B-Zell-Anteil an der Gesamt-Lymphozyten-Suspension direkt bestimmen (B/T-Zell-Ratio). VAN ROOD und VAN LEEUWEN fanden bei dieser Methode eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit anderen Methoden. Allerdings ist sie bei Zellen, die nach Einfrieren und Auftauen mit der Adhärenztechnik gereinigt wurden, nur mit Einschränkungen zu gebrauchen (97, 41).

Eine andere empfindliche Methode (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) wurde 1979 von MANN und SHARROW zum Nachweis von DRw-Antigenen benutzt (68). Hierbei werden die mit Fluoreszein markierten Antigene mit einem Laser angeregt und über einen Bildverstärker in elektrische Signale umgewandelt. Durch Erhöhung der Laser-Energie konnte dann die ausgehende Signalstärke erhöht werden. Damit war es möglich, einige Tausend Moleküle des Fluoreszein pro Zelle zu entdecken (38).

Der "bb"-Test läßt sich ebenfalls zur Typisierung von Gesamt-Lymphozyten (PBL) verwenden (13).

ITAKURA (49) berichtete 1979 über die Testung von DR-Antiseren mittels Radioimmun Inhibition Assay (RIA). Hierbei ist die erforderliche Menge von Antiserum und die Zellzahl wesentlich geringer als beim normalen komplementabhängigen Zytotoxizitätstest. Außerdem erlaubt diese Methode quantitative Aussagen.

Der HLA-DR-Genort

"As all the small pieces were dropped on the floor,
I picked up ten pieces and you picked ten more,
some are unique and some overlap -
looks like many loci - but may be a trap!"

(Aus "Typers's Lament", Julia BODMER zur DNA-Sequenz der Gene des HLA-DR-Genortes) (24)

Über die Lokalisation der Gene, die beim Menschen die Immunantwort kodieren, besteht heute ebenfalls kein Zweifel mehr. Diese Region liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 6. In ihr sind die HLA-Gene dicht benachbart (26) und damit genetisch eng verbunden. Die Lokalisation verdeutlicht Abb. 1.

Die Frage, ob der D/DR-Locus wirklich nur ein einziger ist, ist bis heute nicht eindeutig beantwortet (8). In Mäusen ist bereits nachgewiesen, daß die I-Region in einige Subregionen unterteilt ist, beim Menschen ist das jedoch noch nicht endgültig gezeigt. Es gibt aber Hinweise, daß in der HLA-D- oder -DR-Region Subregionen existieren;

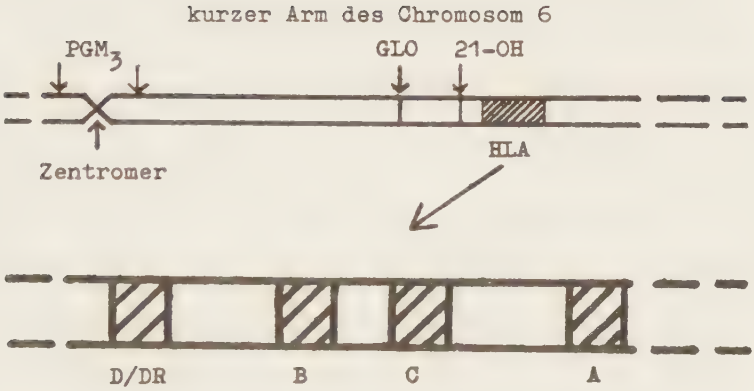

Abb. 1 (nach 110, 117): Lokalisation der HLA-Gene
PGM_3 = Phosphoglucomutase, GLO = Glyoxalase,
21-OH = 21-Hydroxylase

die beste Antwort könnte eine biochemische Analyse der Determinanten geben (5, 10, 21, 74, 84, 98, 100, 101, 103, 109, 124).
PARK et al. (88) postulierten 1977 in einer Familienstudie 2 Loci im HLA-Komplex für B-Lymphozyten-Oberflächen-Antigene. Zum gleichen Ergebnis kamen auch JOHNSEN et al. (50).

Schließlich fanden 1978 TOSI et al. (122) auch mit immunochemischen Analysen genetische und strukturelle Hinweise, daß die von ihnen untersuchten Antigene von getrennten, HLA-verbundenen Loci kontrolliert werden.

1979 zeigte COHEN-MILLER, daß in seinen Untersuchungen die HLA-D-Typisierung mit der LCL-HTC-Methode in nur 20 % der Fälle mit der DR-Serologie übereinstimmt. Er vermutete, daß die verwendeten Dw- und DRw -Spezifitäten noch nicht genügend aufgespalten seien, außerdem könnten D und DR separate Loci sein (28).

Dennoch vermuteten BALNER (10) und THORSBY (117) anhand der 1979 vorhandenen Daten, daß D- und DR-Determinanten wahrscheinlich identisch sind oder aber zumindest auf demselben Molekül getragen werden.

Im selben Jahr konnte ITAKURA (49) durch immunochemische Analyse zweier D/DR-Antigene mittels Radioimmun Inhibition Assay (RIA) nachweisen, daß diese beiden Antigene auf verschiedenen Molekülen

zu finden waren und deshalb von verschiedenen Genloci in der HLA-D-Region kodiert werden müssen. Alle diese Ergebnisse stellten die Aussage des 7. Workshops, auf dem noch die Existenz nur e i n e s Locus angenommen wurde (90, 125), sehr in Frage.

MANN et al. (67) folgerten ebenfalls 1979 aus ihren Untersuchungen, daß auf B-Zellen zumindest 3 Genprodukte ausgedrückt sind, was den Erkenntnissen bei der Maus entsprechen würde, wo ebenfalls mindestens 3 Loci separate Antigen-Determinanten, die vorzugsweise auf B-Lymphozyten ausgedrückt sind, kodieren.

Schließlich zeigten HARKERT und CRESSWELL 1980 mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, daß mindestens 3 Loci die B-Zell-Antigene kodieren (39).

Zur Erklärung der gefundenen Ergebnisse gibt es verschiedene Modelle (3, 101):

Modell 1:
Es gibt 2 getrennte Loci für HLA-D und -DR. Die Ergebnisse reflektieren ein unterschiedliches Kopplungsungleichgewicht zwischen spezifischen DR- und D-Determinanten.
Modell 2:
HLA- D und -DR sind identisch, aber es existiert noch ein weiterer Locus.
Modell 3:
Der HLA-DR-Locus ist ein Teil der HLA-D-Region.
Modell 4:
HLA-D und -DR sind ein Locus. HLA-DR ist ein Teil verschiedener AG-Determinanten auf einem einzelnen Molekül, der mit verschiedenen Methoden und/oder an verschiedenen Molekularstrukturen bestimmt wird. Methodische, serologische und/oder zelluläre Unzulänglichkeiten maskieren Kreuzreaktionen und/oder subtypische Determinanten (Splits).
Modell 5:
D und/oder DR haben mehrere (Sub-) Loci.
Die Abbildung 2 verdeutlicht dieses.

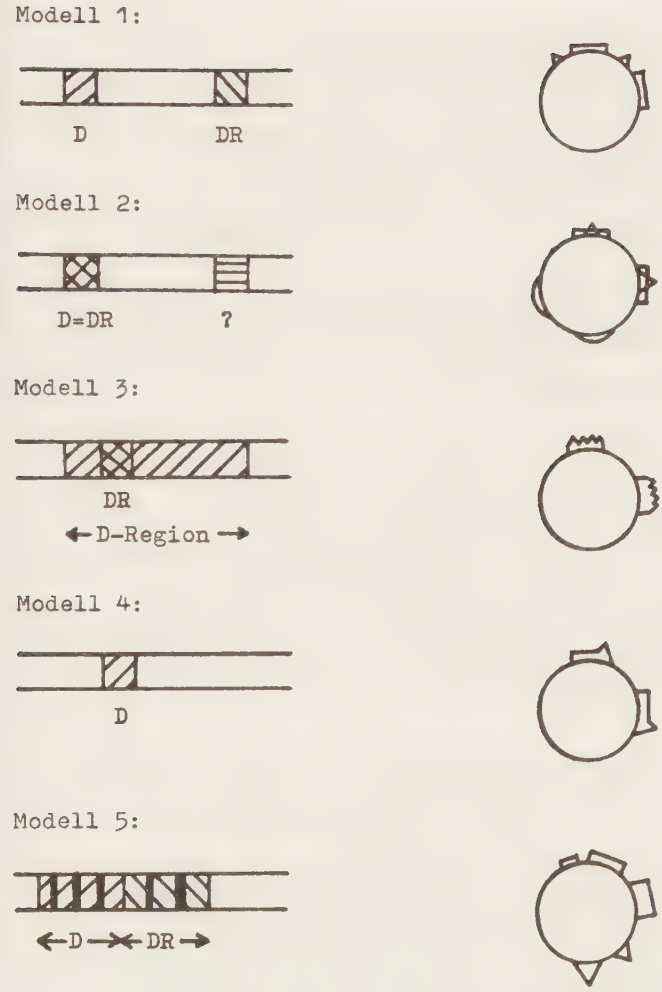

Abb. 2: HLA-Antigene (D= ⊓ , DR= ∧)

Eigenschaften der HLA-DR-Antigene

Viele Aufschlüsse über die Eigenschaften des Immunsystems wurden durch tierexperimentelle Untersuchungen, u.a. bei der Maus, gefunden. Es stellte sich nun die Frage, ob die hier gefundenen Erkenntnisse ohne weiteres auch auf den Menschen übertragbar waren.

Aufgrund des großen Interesses an der Beantwortung dieser Frage war unter anderem die Analogie zwischen dem Antigen-System im Menschen und dem dem H-2 assoziierten Ia-System in der Maus eine wichtige Betrachtung im Entwurf der Ia-Serologie für den 7. Workshop (19).

1977 beschrieben ALBRECHTSEN et al. humane Antiseren, die eine Analogie zu Mäuse-Ia-Antiseren aufwiesen, und SILVER und FERRONE faßten 1979 schließlich die strukturellen Gemeinsamkeiten von DR-Antigenen im Menschen und I-E-Antigenen in der Maus zusammen, so daß nun kein Zweifel mehr bestand, daß der HLA-Genkomplex die Haupthisto-

kompatibilitätsbarriere im Menschen ist und daß Analogien zum H-2-System der Mäuse, RT-1 der Ratten, RhLA der Rhesusaffen und DLA bei Hunden bestehen (1, 4, 96, 102).

Die Antigene auf Lymphozyten wurden zur besseren Unterscheidung in Klassen eingeteilt:

Class I -Antigene sind nach Definition zellgebundene Gene (HLA-A, -B, -C).

Class II -Antigene kodieren die Antikörper-Antwort zu gelösten Antigenen, sie werden Ir-Gene genannt und sind fast identisch mit Ia (Immune-Response-Gene-Associated) -Antigenen und Lymphozyten-Aktivatoren.

Class III -Antigene kontrollieren bestimmte Komplement-Komponenten (42).

Die Produkte der HLA-DR-Gene (HLA-DR-Antigene) sind hochpolymorphe membranassoziierte Glykoproteine. Sie bestehen aus 2 Untereinheiten, einer Alpha-Kette von 35.000 daltons und einer Beta-Kette von 27.000 daltons. Beide unterscheiden sich außerdem

in den N-terminalen Sequenzen und im isoelektrischen Punkt (69, 125).

TOSI et al. vermuteten, daß die DR-Allospezifitäten auf der kleinen Beta-Untereinheit ausgedrückt sind, jedoch kamen KLARESKOG et al. und MARKERT und CRESSWELL zu dem gegensätzlichen Schluß, daß die HLA-DR-Determinanten auf der Alpha-Untereinheit vorhanden sind. Diese beiden unterschiedlichen Standpunkte ließen sich zusammenfassen, wenn einige DR-Spezifitäten Hybriddeterminanten durch enge Assoziation der Alpha- und Beta-Untereinheiten wären (55, 69, 122).

Die HLA-DR-Antigene des Menschen und die Ia-Antigene der Maus entsprechen sich und sind hauptsächlich auf Zellen ausgedrückt, die Immunfunktion haben. Sie vermitteln offensichtlich die Interaktionen zwischen diesen Zellen (102, 107, 125).

1978 zeigten KLARESKOG et al. durch serologische Analysen, daß die schwere HLA-D-Antigen-Kette ein Produkt des HLA-D-Locus ist, es blieb jedoch noch

klar zu zeigen, daß die kleine HLA-D-Antigen-Untereinheit k e i n Produkt des HLA-D-Locus ist. Schließlich konnten MANN et al. 1979 an DR-Antigenen sogar die N-terminale Sequenz der beiden Polypeptidketten analysieren, eine oder beide von ihnen könnten die Antigen-Determinante tragen (55, 67).

Die Antigen-Determinanten, die durch die HLA-A, -B, -C-Loci kodiert werden, sind auf der Oberfläche von fast allen Körperzellen vorhanden; im Gegensatz hierzu sind die HLA-DRw-Antigene nur auf B-Lymphozyten und Monozyten vorhanden (11, 12). Dies war 1978 der Stand der Erkenntnisse.

Neben der allgemeinen Auffassung, daß die DR-Antigene vorwiegend auf B-Zellen ausgedrückt sind, gibt es jedoch auch Hinweise, daß Ia-Antigene auch auf T-Zellen vorhanden sind (2). Hierfür spricht auch die Erkenntnis einiger Autoren, daß B- und T-Zellen zum Teil zusammenarbeiten (79, 105). ZIMMERMANN et al. zeigten 1979, daß aktivierte T-Zellen sogar zum Teil mit DRw-Antiseren reagieren konnten (126).

1975 hatten KATZ et al. bei Untersuchungen an der Maus festgestellt, daß ein oder mehrere Gene die optimale Interaktion zwischen B- und T-Zellen kontrollieren (52).

1977 beschrieben dann ALBRECHTSEN et al. humane Seren, die analog zu Mäuse-Ia-Antiseren waren und die neben einer spezifischen Zytotoxizität für B-Zellen auch die Stimulierung der Zellen in der MLC verhinderten (4, 39).
DORVAL et al. untersuchten im selben Jahr (32) die relative Menge von $ß_2m$ und HLA-Oberflächendeterminanten auf menschlichen Lymphoidzellen. Bei Untersuchungen an B- und T-Zell-angereicherten Suspensionen (nach Rosettierung mit SRBC) wurde $ß_2m$ in ähnlichen Mengen auf B- und T-Lymphozyten gefunden. Dies widersprach anderen Berichten, die zeigten, daß B-Zellen eine etwas größere Menge an membrangebundenem $ß_2m$ haben. Die Autoren begründeten die Unterschiede allerdings mit der Präparationstechnik.

Dennoch bezeichneten 1979 WINCHESTER und KUNKEL die Erscheinung des Oberflächen-Immunglobulins als den klassischen Marker des B-Lymphozyten, während Rosettenformation mit SRBC das meistbenutzte Charakteristikum der T-Lymphozyten ist. So können ca. 90 % der peripheren Lymphozyten identifiziert werden. Die übrigen sind eine 3. oder "Null-Zell"-Population und durch die Abwesenheit sowohl des Oberflächen-Immunglobulins als auch des E-Rosetten-Rezeptors definiert. Diese Drei-Kategorien-Einteilung läßt allerdings andere Hauptrezeptoren außer Betracht. Die Autoren warfen die Frage auf, ob diese 3. Population selbständig sei oder ob sie eine Mischung aus atypischen B- und T-Zellen ist. 70 % der E-Rosetten-negativen Population zeigten Ia-Antigene, während nur 2 % der E-Rosetten-positiven Population dies ebenfalls tun. Deshalb sollte die E-Population "B-Zell-angereichert" genannt werden (125).

Heutiger Stand der Forschung

Der HLA-Komplex ist ein genetisches System von fünf eng verbundenen Genorten auf dem Chromosom 6 (HLA-A, -B, -C, -D, -DR), die die Zelloberflächen-Antigene der Lymphozyten kontrollieren (82). Diese Antigene sind entscheidend für die Immunantwort, sie sind wahrscheinlich durch Duplikation entstanden im Sinne einer permanenten Heterozygozität, die auch bei Inzucht erhalten bleibt (56).

Außerdem sind einige dieser Gene mit bestimmten chronischen Krankheiten assoziiert, ihre Bestimmung kann die Differenzierung dieser Krankheiten in Untergruppen ermöglichen.

Die Immunsysteme in den verschiedenen Spezies entsprechen sich, so daß Rückschlüsse aus den bei Tieren gewonnenen Ergebnissen auf den Menschen möglich sind.

Von unbestreitbarem Wert sind HLA-Typisierungen bei Nierentransplantationen. Die Ergebnisse bei verwandten Spendern und Empfängern sind heute zufriedenstellend, die Schwierigkeiten liegen in den

Transplantationen von Leichennieren. Bei der Auswahl von Spendern und Empfängern unter dem Gesichtspunkt der HLA-Typisierung können eindeutig bessere Überlebensraten erzielt werden. Außerdem lassen sich nach Transplantationen die Abstoßungsreaktionen bis zu einem gewissen Grade voraussagen. Welche Antigene letztendlich hierbei die entscheidende Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. Es besteht die Möglichkeit, daß Typisierungen für weniger polymorphe Systeme als HLA-D/DR, z.B. MB und/oder MT, die besten Ergebnisse erzielen lassen. Diese Antigene (DR, MB, MT) lassen sich vor allem auf B-Lymphozyten, die normalerweise im peripheren Blut nur zu 15 - 25 % vorkommen, nachweisen, so daß sich das Interesse hauptsächlich auf diese Subpopulation konzentriert.

Zur Anreicherung der B-Lymphozyten gibt es verschiedene Verfahren (v.a. Rosettierung mit SRBC, Nylonadhärenz und Reaktion mit Kaninchen-F $(ab')_2$), die alle als gleichwertig anzusehen sind, ebenso verhält es sich mit den Typisierungstechniken. Eine ideale Methode gibt es z.Zt. nicht (9). Die Ergebnisse hängen von der Erfahrung des einzelnen Labors mit der dort eingeführten Methode ab.

Probleme und Schwierigkeiten bei der HLA-Typisierung

Die Schwierigkeiten bei der HLA-DR-Typisierung liegen zum einen in der noch unausgereiften Methodik (unterschiedliche Tests, Beschaffung von Antiseren) und zum anderen in dem noch ungenügenden Wissen über die theoretischen Zusammenhänge.

1979 nannte ITAKURA die Prozedur der Zell-Separation als einen der wichtigsten Faktoren, die die Typisierungsresultate im Zytotoxizitätstest unsicher machen. Hierzu zählen nicht nur die Schwierigkeiten der Trennung von B- und T-Lymphozyten, sondern auch unterschiedliche Kontamination durch übrige Leukozyten, v.a. Monozyten (49). Granulozyten-Kontamination kann sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse bedingen (114).

BORELLI et al. (25) zeigten 1979 bei Testung von B-Zell-Suspensionen mit und ohne Monozyten gegen Anti-DR-Seren, daß die Anwesenheit von Monozyten die Anzahl der positiven Reaktionen erhöhte. Dies ist auf das Vorkommen von B-Lymphozyten-Antigenen

auf Monozyten zurückzuführen, außerdem enthalten B-Lymphozyten-angereicherte Populationen eine verschiedene Anzahl von Monozyten (34). Deshalb entfernten ALBRECHTSEN et al. Makrophagen durch eine Plastik-Gewebekultur, wobei sie den Effekt der Adhärenz von Makrophagen an Plastik-Oberflächen ausnutzten. Vor dieser Prozedur enthielten die B-Lymphozyten-Suspensionen noch ca. 30 % Makrophagen (5, 25).

Ein Jahr später, 1979, beschrieben jedoch MADSEN et al. (66), daß eine Monozyten-Kontamination bei Verwendung des Dichtegradienten Lymphoprep^{R} bei ca. 3 % liegt. Um evtl. vorhandene Monozyten in jedem Fall zu erkennen und die Typisierungsergebnisse entsprechend bewerten zu können, empfahlen TERASAKI et al. 1977 eine positive Kontrolle mittels Kaninchen-Anti-B-Lymphozyten-Serum. Dieses zeigt auch eine Kontamination mit T-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten an, denn wenn dieses Serum nur sehr schwache Reaktionen zeigt, müssen falsch-negative Gesamtreaktionen erwartet werden (114).

Weitere Unterschiede in den Testergebnissen und Schwierigkeiten liegen auch in dem noch nicht ausgereiften und genügend standardisierten komplementabhängigen Zytotoxizitäts-Test. TING et al. vermuteten 1978, daß er nicht empfindlich genug sei, außerdem ergäbe er zum Teil falsch-positive und falsch-negative Resultate (21, 120).

So können bestimmte Präparationsschritte unter Umständen bereits zu Zellmembranschäden oder Verlust von Oberflächen-Immunglobulin führen (41), ebenso eine Vorbehandlung der separierten Lymphozyten, wie z.B. Einfrieren/Auftauen (41, 55).

Andererseits konnten BORELLI et al. zeigen, daß schwache DR-Antikörper gelagerte Zellen besser zu lysieren vermochten als frische Zellen (25).

Das gebrauchte Komplement sollte auf jeden Fall zwar aktiv, aber nicht toxisch für B-Zellen sein, da B-Lymphozyten zum Teil auf die mit ihnen gemachten Manipulationen empfindlicher reagieren als T-Zellen (20, 21).

Schon 1977 beschrieben BODMER et al. (19), daß Unterschiede in der Aktivität und Toxizität von Kaninchen-Komplement bei HLA-A, -B, -C -Typisierungen bestehen und daß sie einen großen Einfluß auf die Typisierungsresultate haben. Dieses Problem vergrößere sich noch bei B-Lymphozyten-Typisierungen, da sie im allgemeinen empfindlicher auf Komplement-Toxizität reagierten als normale PBL.

BELVEDERE et al. (15) verwandten deshalb im serologischen Test für B-Lymphozyten-Typisierungen zum Teil menschliches Komplement, um die ungleichen Resultate und den hohen background, dessen Ursache sie im Kaninchen-Komplement sahen, auszuschalten. Sie testeten allerdings Lymphoidzellen, die nach BODMER (21) viel empfindlicher gegenüber der Toxizität von Kaninchen-Komplement sind als normale periphere Lymphozyten.

CURTONI et al. (30) fanden jedoch 1979 keinerlei Unterschiede zwischen verschiedenen Komplement-Pools bei der HLA-DR-Typisierung; sie stellten für ihr Labor fest, daß das Komplement die

HLA-DR-Typisierungen nicht stärker beeinflußte als die HLA-A, -B, -C -Typisierungen.

Bis auf die Komplementabhängigkeit werden alle diese Schwierigkeiten bei dem von VAN ROOD und VAN LEEUWEN (97) beschriebenen 2-Farben-Fluoreszenz-Test umgangen.

Was das heutige Wissen anbelangt, besteht weiterhin eine große Unsicherheit darin, ob die verschiedenen Tests auf das gleiche Ziel ausgerichtet sind, d.h. ob sie auch genau die gleichen Antigen-Determinanten erfassen. Insbesondere haben die Typisierungstechniken für HLA-D-Locus-Antigene noch nicht das Präzisionsniveau von HLA-A, -B, -C -Typisierungen erreicht (84). Die ersten Unterschiede ergaben sich schon zwischen serologischer und zellulärer Typisierung (21), was die Frage aufwarf, ob der zellulär definierte HLA-D-Locus mit dem serologisch definierten HLA-DR-Locus identisch ist.

Eine weitere große Schwierigkeit besteht in der Beschaffung von Ia-Antiseren. Die Versorgung hiermit ist stark begrenzt (19), z.T. sind sie Mischungen aus schwachen Antikörperlösungen, deren Spezifitäten in Linkage Disequilibrium mit dem gesuchten Antigen stehen; die hiermit verbundene nicht eindeutige Spezifität wirkt sich besonders bei der Bestimmung sogenannter Subtypen (Splits) bei der serologischen Typisierung aus (78). Jedes Labor ist heute auf selbst beschaffte, eigene Seren angewiesen, da die von der Industrie angebotenen nicht ausreichen.

Solche Antiseren werden mittels Suchprogrammen aus verschiedenen Personengruppen ausgewählt (Schwangere, Blutspender). Eine Immunisierung von Freiwilligen zur gezielten Herstellung von antikörperhaltigen Seren ist in Deutschland aus ethischen Gründen nicht möglich (2).

Die Seren müssen, um ihre Wirksamkeit nicht zu verlieren, sachgemäß gelagert werden. BORELLI et al. (25) zeigten 1979, daß Anti-DR-Seren, auch tiefge-

froren bei -30° C, einen bemerkenswerten Verlust ihrer Aktivität erleiden können.

Vor einer HLA-DR-Typisierung müssen die noch im Serum vorhandenen HLA-A, -B, -C -Antikörper entfernt werden. Die sich hierfür anbietende Thrombozyten-Absorption beinhaltet einige Schwierigkeiten. Es konnte wiederholt festgestellt werden, daß die gepoolten Thrombozyten nicht alle HLA-A, -B, -C -Antikörper absorbierten (25).

Zum Teil sind diese Reaktionen, die in ca. 1/3 der Fälle vorkamen (25), auf Reaktionen von noch vorhandenen HLA-C-Antikörpern zurückzuführen. BORELLI (25) drückte 1979 eine allgemeine Erfahrung aus, daß die Absorption von HLA-C-Antikörpern mit frischen Thrombozyten durchgeführt werden muß; ein paar Tage nach ihrer Präparation können diese Thrombozyten nicht mehr diese Antikörper absorbieren. Während des 8. Workshops wurde jedoch von VAN LEEUWEN und VAN ROOD festgestellt, daß die insgesamt besten Ergebnisse mit mindestens 3 Wochen alten Thrombozyten-Suspensionen zu erhalten seien (61).

Alle diese Probleme führten dazu, daß die Typisierung als Mittel der Vorhersage eines Transplantationsergebnisses, vor allem von Leichennieren, in den letzten zehn Jahren sehr häufig diskutiert worden ist (27). Vor allen Dingen kann die B-Zell-Serologie noch nicht als eine verläßliche Methode für das Routine-Typisierungslabor angesehen werden (20).

Fragestellung/Problem

Zusammenfassung der Tatsachen/Schwierigkeiten

1. Es gibt verschiedene Methoden zur serologischen HLA-DR-Typisierung, die jedoch alle nicht vollständig ausgereift sind und z.T. einen großen technischen Aufwand bedingen.
2. Es stehen z.Zt. DR-spezifische Testseren nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

Fragestellung

Aufgrund der o.g. Fakten ergab sich eine zweigeteilte Fragestellung:

1. Auswahl einer der serologischen Methoden und Aufbereitung mit dem Ziel der Anwendung im Routinelabor.
2. Mit dieser Methode Suche nach DR-spezifischen Antiseren unter Blutspendern.

Methodik

Als serologische Typisierungsmethode wurde der komplementabhängige Mikrozytotoxizitätstest ausgewählt. Dieser Test ist weltweit am meisten verbreitet, und es ist der serologische Standardtest für HLA-A, -B, -C -Typisierungen.

Für die Trennungsprozedur der B- und T-Lymphozyten fiel die Wahl auf die Rosettierungsmethode, mit ihr sind ausreichende Reinheitsgrade zu erzielen.

Die Absorption der störenden HLA-A, -B, -C -Antikörper in den Testseren wurde mit Thrombozyten durchgeführt.

Prinzip

Die zur DR-Typisierung benötigten B-Lymphozyten werden aus heparinisiertem Vollblut isoliert, indem man zunächst wie für die HLA-A, -B, -C -Typisierung die Gesamt-Lymphozyten (PBL) isoliert, dann die T-Zellen mit Schaf-Erythrozyten Rosetten bilden läßt, diese abzentrifugiert und dann die B-Lymphozyten mit den von HLA-A, -B, -C -Antikörpern

gereinigten Test-Antiseren reagieren läßt. Anschließend führt Komplement bei den Lymphozyten mit erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion zur Zytolyse, in diese Zellen kann Farbstoff eindiffundieren. Der ganze Vorgang wird mit Formalin fixiert und unter dem umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop abgelesen.

Beschreibung

Zunächst wurde zur Isolierung der PBL von der im Labor bereits eingeführten Technik für die Testung auf HLA-A, -B, -C -Antigene ausgegangen. Es wurden jedoch für die Typisierung von nur B-Lymphozyten einige Änderungen nötig. Da B-Lymphozyten glasadhärent sind, müssen alle Präparationsschritte in Plastikmaterial durchgeführt werden.

B-Zell-Präparation

Lymphozyten-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-Lymphozyten (PBL) werden 20 ml heparinisiertes Vollblut abgenommen. Dieses Blut wird, nur in Plastik-Material, mit physiologischer

Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 2 Blut/NaCl verdünnt und jeweils 6 ml über 3 ml Lymphoprep^{R} überschichtet. Nach der Zentrifugation bei 2.500 UpM für 10 Min. können die PBL aus der Interphase mit einer Plastik-Pasteurpipette abgesaugt und in zwei graduierte Plastik-Spitzröhrchen à 10 ml überführt werden. Die Röhrchen werden mit dem Nährmedium RPMI 1640 aufgefüllt, die PBL zweimal mit dem Medium gewaschen und dabei auf eine Zellkonzentration von 2.000/µl durch Variation der Menge des Nährmediums eingestellt. Um die Lymphozytensuspension möglichst rein zu erhalten, sollte bei den Waschvorgängen jeweils der Überstand ganz dekantiert werden.

Folgende Änderungen haben sich für die Typisierung von B-Lymphozyten-angereicherten Suspensionen im Gegensatz zur Typisierung von PBL als zweckmäßig erwiesen:

1. Abnahme des Vollblutes in 20 ml Einmalspritzen mit bereits vorgelegtem Heparin; industriell gelieferte, bereits mit Antikoagulantien beschichtete Einmalröhrchen sind für B-Lymphozyten zu aggressiv.

2. Die Menge des abgenommenen Spenderblutes mußte von 10 ml auf 20 ml verdoppelt werden. In diesen 20 ml sind normalerweise 3×10^6 - 20×10^6 B-Lymphozyten enthalten, so daß bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml ca. 1,5 - 10 ml B-Lymphozyten-angereicherter Suspension erhalten werden können.

3. Da die B-Lymphozyten glasadhärent sind, müssen alle Prüparationsschritte in Plastik-Material durchgeführt werden.

4. Hank's Lösung ist als Nährmedium nicht ausreichend, die Lymphozyten müssen nach der Trennung vom Plasma in RPMI 1640 oder McCoy's 5a gehalten werden.

5. Beim Waschen der Zellsuspension müssen die Überstände nach der Zentrifugation vollständig dekantiert werden, um die Kontamination (background) so gering wie möglich zu halten.

Präparation der Schaf-Erythrozyten
(Sheep Red Blood Cells, SRBC)

In den ersten zwei Monaten wurden die SRBC aus frisch dem lebenden Tier entnommenem, heparinisiertem Vollblut isoliert, da sich in Vorversuchen industrielle SRBC-Konserven für die Rosettierung z.T. als ungeeignet herausgestellt hatten.

Es wurden 20 ml Schaf-Vollblut vom lebenden Tier in Glasröhrchen aufgefangen, in denen Heparin bereits vorgelegt war. Das Blut wurde sofort bei 2.000 UpM für 7 Min. zentrifugiert, der Überstand sowie die über der obersten Schicht der Erythrozyten befindlichen Thrombozyten wurden abgesaugt. Die Erythrozyten wurden anschließend 2 x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zur Aufbewahrung wurden sie in Alsever'scher Lösung resuspendiert und bei +4° C im Kühlschrank gehalten.

Nach zwei Monaten führten wir die Rosettierung parallel mit SRBC vom lebenden Tier und einer industriellen SRBC-Konserve durch. Es zeigte sich,

daß die konservierten Erythrozyten, wenn sie mindestens 3 x in physiologischer Kochsalzlösung sofort nach Öffnung der Konserve gewaschen wurden und ebenfalls in Alsever'scher Lösung bei +4° C aufbewahrt wurden, ebenso gute Rosetten bildeten wie die frischen SRBC. Bei +4° C waren die SRBC in Alsever'scher Lösung ca. 10 Tage für die Rosettierung zu verwenden.

Vor der direkten Weiterverarbeitung wurden die Erythrozyten noch einmal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und der Überstand sowie überschüssige Erythrozyten bis auf 0,2 ml abgesaugt. Diese Menge wurde mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, mit 0,1 ml Neuraminidase versetzt und 15 Min. langsam auf dem Rotor gemischt (N-SRBC). Nach dem Abzentrifugieren und weiterem zweimaligem Waschen wurden die NSRBC zum Schluß in 10 ml RPMI 1640 resuspendiert (2 %ige Lösung NSRBC).

LONGO und FERRARA haben noch 1980 betont, daß die SRBC wöchentlich frisch sein müssen (63).

Wir konnten zeigen, daß bei bestimmter Präparation Schaf-Erythrozyten-Konzentrate einiger Hersteller den frischen SRBC in Hinblick auf die Rosettenbildung gleichwertig waren. Eine Aufbewahrung der präparierten SRBC ist bei +4° C bis zu 10 Tagen möglich; wenn die Erythrozyten bereits Sphärozytenform angenommen hatten, bildeten sie sogar bessere Rosetten als frische. Die Resuspension muß ebenfalls in RPMI 1640 oder McCoy's 5a erfolgen, da sonst bei der anschließenden Mischung der NSRBC mit den PBL eine zu geringe Konzentration an Nährmedium für die B-Lymphozyten vorhanden wäre. Nach der Neuraminidase-Behandlung muß diese gut ausgewaschen werden, um eine Beeinflussung der B-Lymphozyten durch Neuraminidase zu vermeiden.

B-Zell-Präparation (Rosettierung)

Zur Trennung der B- und T-Lymphozyten werden gleiche Mengen der PBL-Zellsuspension und der NSRBC in Plastikröhrchen gemischt und jeweils maximal 5 ml über 3 ml Lymphoprep® überschichtet. In diesem Zustand wird die Suspension bei +4° C für 30 Min. inkubiert. Es bilden sich Rosetten aus T-Lymphozyten und Schaf-Erythrozyten (siehe Abb. 3).

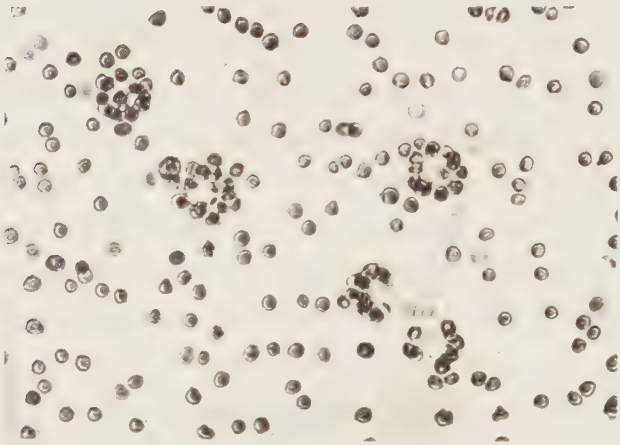

Abb. 3: T-Lymphozyten/SRBC-Rosetten:
Es sind die Kerne von 5 T-Lymphozyten mit angelagerten Schaf-Erythrozyten sowie freie Erythrozyten zu erkennen.

Diese werden anschließend bei 2.500 Upm für 10 Min. abzentrifugiert, die B-Lymphozyten bleiben als Zellring in der Interphase. Diese Zellringe

werden in ein graduiertes Spitzröhrchen überführt und 2 x mit RPMI 1640 gewaschen, dabei wird der Überstand jeweils ganz dekantiert und dann mit frischem Nährmedium aufgefüllt. Die Zellen werden auf eine Konzentration von 2.000/µl durch Variation der Menge des zugegebenen Nährmediums eingestellt.

Falls die B-Lymphozyten in diesem Zustand längere Zeit (1 - 2 Tage) aufbewahrt werden sollen, müssen sie statt in RPMI 1640 in McCoy's 5a gehalten werden.

Durch Inkubation der Suspension direkt über dem Dichtegradienten (Lymphoprep^{R}) und die dadurch vermiedene mechanische Irritation der Rosetten beim Überschichten über den Dichtegradienten nach der Inkubation, konnten wir den Anteil an B-Lymphozyten in der zur Typisierung verwendeten Suspension von 70 % auf 90 % erhöhen. Durch vollständiges Abkippen der Überstände statt Absaugen bei den Waschvorgängen konnten wir die Kontamination (background) der Lymphozyten-Suspension deutlich verringern und damit die Ablesegenauigkeit erhöhen.

Aufbereitung der Testseren

Thrombozytenpräparation

Zur Herstellung der Thrombozytensuspension für die Absorption der HLA-A, -B, -C -Antikörper aus den Testseren wurden aus der Blutbank Thrombozytenkonzentrate (buffy coat) von ca. 80 - 100 Blutspendern gepoolt. Diese Thrombozytenkonzentrate waren noch mit Erythrozyten und Leukozyten kontaminiert.

Zunächst wurden die Konzentrate mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und dann die kontaminierenden Erythrozyten und Leukozyten bei 1.800 UpM für 10 Min. abzentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Thrombozyten wurde erneut zentrifugiert (20 Min., 3.000 UpM) und die sich als Sediment absetzenden Thrombozyten dann zweimal in NaCl-Lösung gewaschen. Resuspendiert in Kochsalzlösung, die mit 0,1 % NaN_3 versetzt worden war, waren die Thrombozyten im Kühlschrank über mehrere Monate haltbar. Vor Gebrauch wurden die Thrombozyten in zwei Präparationsstufen mit Kochsalzlösung gewaschen.

Absorption der HLA-A, -B, -C -Antikörper

Zur Absorption der HLA-A, -B, -C -Antikörper wurden für jedes Testserum folgende Präparationsschritte durchgeführt:

1 ml des Testserums wurde in Beckmann-Röhrchen mit 1 ml der Thrombozytensuspension für 24 h im Wärmeschrank bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten mit den gebundenen Wärme-Antikörpern abzentrifugiert, das überstehende Serum wurde erneut mit 1 ml frischer Thrombozytensuspension gemischt. Die zweite Inkubation erfolgte bei +4° C im Kühlschrank, ebenfalls für 24 h. Nach dem Abzentrifugieren der Thrombozyten mit den absorbierten Kälte-Antikörpern wurde das gereinigte Serum in Beckmann-Röhrchen zur Aufbewahrung überführt und in die Testplatten eingespritzt.

Verwendet wurden industriell gefertigte Testplatten mit 6 x 10 Vertiefungen. Pro Vertiefung wurden 5 µl dickflüssiges Paraffinöl eingetropft und je 1 µl des gereinigten Antiserums in die jeweilige Vertiefung unter das Öl eingespritzt. Einige Vertiefungen dienten der Kontrolle, sie enthielten

reines Nährmedium, Antilymphozytenserum oder Anti-B-/Anti-T-Serum. Die so vorbereiteten Testplatten können über Monate bei -80° C aufbewahrt werden.

Test

In die aufgetauten Platten wird 1 µl der B-Lymphozytensuspension eingespritzt und die Platten, vor Sonne geschützt, bei Zimmertemperatur für 1 h inkubiert (Antigen-Antikörper-Reaktion). Sodann werden 5 µl Kaninchen-Komplement zugegeben und die Platten erneut für 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert (Zellmembranschädigung). Danach werden die lysierten Zellen mit je 5 µl 5 %iger wässriger Eosin-Lösung pro Vertiefung angefärbt und die Reaktion nach 15 Min. mit 5 µl Formalinlösung fixiert. Anschließend wird die Testplatte mit einem Deckglas abgedeckt, die Lymphozyten sedimentieren, so daß sie in einer Schicht liegen und mikroskopisch besser fokussiert werden können.

Bei der Testung von B-Lymphozyten-angereicherten Suspensionen im Gegensatz zu PBL-Suspensionen ist

es nötig, die Inkubationsschritte der Antigen/ Antikörper-Reaktion und der Komplement-Bindung zu verdoppeln.

Die Reaktion wird unter dem umgekehrten Phasenkontrastmikroskop abgelesen. Hierbei wird der Prozentsatz der lysierten (= gefärbten) Zellen geschätzt. Eine Zytolyse bedeutet, daß eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat und die Zellmembran durch das Komplement so geschädigt wurde, daß der Farbstoff eindringen konnte und sich die Doppelbrechung verlor. Lysierte, d.h. gefärbte Zellen, sehen wegen des eingedrungenen Farbstoffes rot und nichtdoppelbrechend aus, während noch vitale Zellen weiterhin doppelbrechen.
Die Reaktionsstärke wird nach internationaler Übereinkunft wie folgt bewertet:

10 - 20 % lysierte Zellen : 1-fache Reaktion
20 - 50 % " " : 2-fache "
50 - 75 % " " : 3-fache "
75 - 100 % " " : 4-fache "

Kontrollen

Phagozytose-Test

Um die Kontamination der B-Lymphozytensuspension mit Monozyten festzustellen, wurden die Zellen mit einer Hefesuspension versetzt. Dazu wurde Trockenhefe in NaCl-Lösung gelöst, 10 Min. zur Inaktivierung im Wasserbad gekocht und kurz zur Anreicherung zentrifugiert. Diese Suspension wurde den Lymphozyten zugegeben und nach jeweils 30 und 60 Min. ein Zellausstrich angefertigt, der dann angefärbt wurde. Die Monozyten konnten nun durch die phagozytierten und angefärbten Hefezellen identifiziert und so ihr relativer Anteil ermittelt werden (39).

Es ergab sich hierbei eine Kontamination von weniger als 5 % mit Monozyten. Dies ist auf die zweimalige physikalische Separierung der Zellen mit Lymphoprep^{R} als Dichtegradienten zurückzuführen (66).

Kontrollseren

Außerdem wurden alle Nicht-B-Lymphozyten später im Test durch eine positive Kontrolle mit Anti-B-

Lymphozytenserum auf den Platten als negative Reaktion erkannt, ihre relative Anzahl wurde bei der Beurteilung der Reaktionsstärke mit berücksichtigt.

Immunfluoreszenz

Um den Anteil von B-Lymphozyten vor und nach der Rosettierung mit SRBC zu ermitteln, wurden die B-Zellen jeweils mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) angefärbt, da die Fluorescein-konjugierten Antikörper mit dem auf B-Zellen vorhandenen Oberflächen-IgG reagierten. So konnte die B/T-Zell-Ratio im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop mit Fluoreszenz-Einrichtung direkt abgelesen werden.

Vor Rosettierung ergab sich erwartungsgemäß ein B-Zell-Anteil von 15 - 25 %, nach Rosettierung ein Anteil von über 90 %.

Diskussion der Methode

Die Methode wurde erprobt und ist in der beschriebenen Weise als Routine eingeführt.

Im Rahmen eines nationalen Zellaustausches in der Bundesrepublik konnten mit dieser Methode der B-Zell-Typisierung auf DR/DRw-Antigene vergleichsweise gute bis sehr gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der Referenzlabors erzielt werden.

Suche nach DR/DRw-spezifischen Antiseren

Auswahl der Seren

Für die Suche nach DR/DRw-spezifischen Antiseren, die als Testseren in der weiteren Diagnostik Verwendung finden können, wurden im Rahmen einer Vorauswahl Seren von Schwangeren und Blutspendern ausgewählt, die zytotoxische, nicht gegen HLA-A, -B, -C -Antigene gerichtete Antikörper enthielten, Seren mit Antikörpern gegen HLA-A, -B, -C -Antigene, die bekanntermaßen in hohem Linkage Disequilibrium mit bestimmten D/DR-Antigenen stehen und Seren mit einem allgemein schwachen Antikörper-Titer.

Diese Seren wurden nach der auf S. 70 beschriebenen Technik aufbereitet.

Screening

In einem Zeitraum von 18 Monaten wurden Blutspender sowohl nach HLA-A, -B, -C -Antigenen (PBL) als auch nach DR-Antigenen (B-Lymphozyten) typisiert.

Die Typisierungen nach DR-Antigenen erfolgten jeweils parallel mit den Seren der Vorauswahl und mit Referenzseren auf Platten des TERASAKI-Labors, Los Angeles (UCLA 6 und 8).

Zellaustausch

Im Rahmen eines nationalen Zellaustausches wurden ebenfalls B-Lymphozyten getestet, deren DR-Spezifitäten später veröffentlicht wurden. Somit war es uns möglich, die Seren der Vorauswahl und ihre Verdachtsspezifitäten statistisch auszuwerten.

Statistische Ausarbeitung

Es wurden insgesamt 139 Seren auf das Vorhandensein von DR-Antikörpern getestet. Von diesen Seren erschienen diejenigen interessant, die bei den Zellaustausch-Zellen möglichst eindeutige starke Reaktionen zeigten. Hier wurde bereits auf die möglichen Verdachtsspezifitäten geschlossen.

Multispezifische Seren, d.h. Seren mit relativ vielen starken Reaktionen und Seren, die nur wenige und keine starken Reaktionen zeigten, wurden nicht weiter verarbeitet.

So konnten schließlich 42 Seren statistisch ausgewertet werden.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem χ^2 - Test für eine Vierfeldertafel, Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %. Die bei dieser Lösung erhaltene Prüfgröße kann jedoch eine Signifikanz vortäuschen, die in Wirklichkeit nicht immer

gegeben ist. Um dieses zu vermeiden, wird die Yates'sche Korrekturformel benutzt. Es gibt daher Fälle, in denen der K^2 - Test signifikant ist, der korrigierte K^2 - Test aber keine Signifikanz aufzeigt. Dieses tritt ein bei kleinen richtig-positiven und/oder richtig-negativen Ergebnissen in der vorhandenen Stichprobe. Da die Anzahl der national ausgetauschten Zellen mit bekannter DR-Spezifität aber im Vergleich zu der Vielfalt und der Seltenheit einiger DR/DRw-Gene z.T. zu gering war, ergeben sich nach statistischer Auswertung vier Klassen:

1. Signifikante Seren, auch nach Yates'scher Korrektur
2. Signifikante Seren, wenn 3- und 4-fache Reaktionen als positiv, 1- und 2-fache Reaktionen als negativ gewertet werden (stark reaktive Seren)
3. Signifikante Seren, wenn 2-, 3- und 4-fache Reaktionen als positiv gewertet werden (schwach reaktive Seren)
4. Fragliche

In der letzten Klasse (Fragliche) ist trotz Signifikanz keine genaue Aufschlüsselung möglich, da die vorhandenen Tests noch nicht umfangreich genug waren bzw. das Merkmal in unserer Stichprobe zu selten vorkam, um eine eindeutige Zuordnung zu e i n e m DR/DRw-Antigen vorzunehmen.

MB und MT

Entsprechend der Nomenklatur des 8. Workshop schließen die MB- und MT-Spezifitäten folgende DR-Antigene ein:

MB 1: DR 1, DR 2, DRw 6	(36)
MB 2: DR 3, DR 7	(36)
MB 3: DR 4, DR 5	(36)
MT 1: DR 1, DR 2, DRw 6	(123)
MT 2: DR 3, DR 5, DRw 6, DRw 8	(51)
MT 3: DR 4, DR 7, DRw 9, DRw 10	(30)

Ergebnis

Es wurden unter Blutspendern im Rahmen einer Screening-Untersuchung 15 Seren gefunden, die als DR-Antikörperhaltige Testseren für einen serologischen Test auf MB-/MT-Antigene in Frage kommen. Von diesen

waren 3 Seren hochsignifikant (G 6: DR 7; G 20: DR 7; DRw 3: MB 2), 4 Seren zeigten keine falsch-positive oder falsch-negative Reaktion (G 20: DR 7; DRw 3: MB 2; G 19: DR 5; D 23: DRw 10). Insgesamt 11 Seren zeigten eindeutige signifikante Reaktionen mit einem DR- oder MB-Antigen (G 6: DR 7; G 20: DR 7; DRw 3: MB 2; G 2:DR 1; G 19: DR 5; D 6: DR 7; D 19: DR 4; D 23: DRw 10; D 25: DR 7; D 22: DR 7; D 2: DR 3), bei 5 Seren kommen aufgrund des geringen Stichprobenumfanges des Zellaustausches 2 mögliche Spezifitäten in Betracht (BS 25, D 39, D 115, D 86 jeweils DR 1 oder DR 5; Serum DRw 7: DR 7 oder DRw 8).

Diskussion der Auswertung der Seren

Es konnten aus 139 Seren von Blutspendern, in denen monospezifische HLA-DR/DRw-Antikörper vermutet wurden, 4 Seren ausgewählt werden, die eine statistisch gesicherte Monospezifität aufweisen. Sie zeigten keinerlei falsch-positive oder falsch-negative Reaktionen und erreichten damit K^2-Werte von 10,0 und darüber. Diese Seren (G 19, D 23, G 20, DRw 3) erfassen die Antigene DR 5, DR 7, DRw 10, MT 2.

Die Seren G 19 und D 23 erfassen jeweils eine Spezifität, die in den Zellen des nationalen Zellaustausches nur jeweils einmal vorkam. Die damit verbundene geringe Anzahl der richtig-positiven Reaktionen ließ den K^2 - Test nach Yates'scher Korrektur nicht mehr eine signifikante Aussage. Es ist daher nötig, insbesondere das Serum D 23 wegen seiner Vorabsorptionsspezifität DRw 10 weiterhin zu testen, da die Spezifität DRw 10 international noch nicht eindeutig definiert worden ist. Es besteht hier die Wahrscheinlichkeit, daß unter

139 Seren ein monospezifisches Serum für eine international noch nicht eindeutig definierte Spezifität gefunden worden ist.

Da von einigen Autoren die Vermutung ausgedrückt wurde, daß die MB- und/oder MT-Spezifitäten eventuell die Antigene umfassen, die für die Abstoßung nach Transplantationen relevant sind, gewinnt das Serum DRw 3 an Bedeutung. Bisher als mögliches, nicht eindeutig reagierendes monospezifisches Serum für HLA-DR 3 betrachtet, zeigte es bei uns bei der Auswertung nach MB/MT-Antigenen eine hohe Signifikanz für MB 2.
Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt hier ein Serum vor, mit dem die die in MB 2 eingeschlossenen DR-Antigene direkt und eindeutig erfaßt werden.

Mit den Seren G 19 (DR 5) und G 20 (DR 7) wurden Seren gefunden, die für international bereits eindeutig definierte DR-Antigene spezifisch sind. Ihre Bedeutung liegt damit in ihrem eigenen Leben im Einsatz in der HLA-DR-Typisierung und im Ersatz von bisher fremd beschafften Seren.

Tabelle A: HLA-DR/DRw-Antikörperhaltige Seren

Serum-Nr.	Spezifität	+/+	+/-	-/+	-/-	x^2
Signifikant (nach Yates'scher Korrektur)						
G 6	DR 7	3	0	1	9	8,775 (5,05)
G 20	DR 7	3	0	0	11	14,0 (8,69)
DRw 3	MB 2	6	0	0	4	10,0 (6,27)
Starke Reaktionen						
G 2	DR 1	2	0	2	9	5,31
G 19	DR 5	1	0	0	13	14,0
D 6	DR 7	2	1	1	9	4,17
D 19	DR 4	1	0	1	10	5,45
D 23	DRw 10	1	0	0	12	13,0
Schwache Reaktionen						
D 25	DR 7	2	1	0	10	7,87
D 22	DR 7	2	1	0	10	7,87
D 2	DR 3	3	3	0	7	4,55
Fragliche						
DRw 7	DRw 8	2	1	0	7	5,83
DRw 7	DR 7 schwach	2	0	1	7	5,83
BS 25	DR 1 / DR 5	1	0	1	8	4,44
D 39	DR 1 / DR 5	1	0	0	9	10,0
D 115	DR 1 / DR 5	1	0	0	9	10,0
D 86	DR 1 / DR 5 stark	1	0	0	9	10,0

Tabelle B: Seren ohne signifikante Korrelation

Serum-Nr.	Spezifität	+/+	+/-	-/+	-/-
D 54-2	DR 3	2	2	0	6
D 91	DRw 8	1	2	0	7
D 37	MT 2	2	7	0	1
D 40	MT 1	2	3	0	5
D 73-2	MT 2	4	4	0	1
D 127	MT 2 schwach	4	3	0	1
D 113	DR 7	1	1	0	8
D 86-2	DR 7	1	1	0	8
B 39-3	DR 7	1	1	0	8
D 76-5	DR 3 / DRw 6	1	3	0	6
B 36	DRw 6	2	2	0	6
D 123-2	DRw 6	2	2	0	6
A 1533-2	DRw 8	1	2	0	6
D 76-2	DR 3	2	4	0	6
R.M.	DR 1	1	1	0	11
S 110	DRw 6	2	3	0	8
S 177	DR 7	1	2	1	9
S 177	DRw 8	1	3	1	8
S 177	DRw 6	1	4	1	7
S 177	DR 3 schwach	2	4	1	6
S 171	DR 3	2	2	0	6
D 28	DR 3	2	4	0	7
S 302	DR 7	1	2	0	10
D 81	DR 7	1	2	0	10
S 40	DRw 8	1	3	0	9
D 4	DRw 6	1	4	0	8
D 11	DRw 8	2	2	1	8
WAE	DR 7	1	2	0	10
D 9	DR 7	1	2	0	10

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Albert, E.D., Götze, D.:
The Major Histocompatibility System in Man
in: Götze, D. (Ed.): The Major Histocompatibility System in Man and Animals, Springer Verlag 1977, 7-77

2. Albert, E.D., Andreas, A., McNicholas, A., Scholz, S., Kuntz, B.:
B- and T-Cell-Specific Alloantigens in Man
Scand J Immunol 1977/6/427-430

3. Albrechtsen, D., Solheim, B.G., Thorsby, E. (Eds.):
Joint Report from a Workshop on Methods for Identification of Human B Lymphocyte (Ia-like) Alloantigens
Tissue Antigens 1976/8/379-384

4. Albrechtsen, D., Solheim, B.G., Thorsby, E.:
Serologic Rekognition of HLA-D-Associated Determinants
Transplant Proc 1977/9/435-437

5. Albrechtsen, D., Solheim, B.G., Thorsby, E.:
Relationship of HLA-D Associated B Lymphocyte (Ia-like) Antigens in the Cell Membrane
Tissue Antigens 1978/11/372-383

6. Antonelli, P., Kamoun, M., Hansen, J.A., Dupont, B.:
Cross-Reactivity of Anti-DRw Sera Evaluated by Serologic Studies on Established B-Lymphoid Cell Lines
Transplant Proc 1978/10/849-851

7. D'Apice, J.F., Tait, B.D.:
Most positive B cell crossmatches are not caused by anti-HLA-DR antibodies
Transplantation 1980/30/382-383

8. Augenstein, H., Eberhard, B., Weitmann, R., Fischer, M., Eckert, G., Goldmann, S.F.:
Assoziationsanalyse der HLA-DR/D-Determinanten sowie ihre Assoziation zu HLA-A,-B,-C-Antigenen
Vortrag auf der 13. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Histokompatibilitätstestung, Hannover, 8.-10. Okt. 1981

9. Ayoub, G., Terasaki, P.I., Park, M.S., Nakata, S., Ting, A.:
Evaluation of the Quality of B Cell Typing in Kidney Transplant Donors and Recipients
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 634-637

10. Balner, H.:
Are D and DR Antigens Identical? A Review of Available Data for Man and the Rhesus Monkey
Transplant Proc 1979/11/657-664

11. Barnstable, C.J., Jones, E.A., Bodmer, W.F., Bodmer, J.G., Arce-Gomez, B., Snary, D., Crumpton, M.J.:
Genetics and Serology of HL-A-linked Human Ia Antigens
Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1977/41/443-455

12. Barnstable, C.J., Jones, E.A., Crumpton, M.J.:
Isolation, Structure and Genetics of HLA-A,-B,-C and -DRw (Ia) Antigens
Br Med Bull 1978/34/241-246

13. Batchelor, J.R., Morris, P.J., Dick, H., Kennedy, L.J.:
HLA and Disease
in: Bodmer, W.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G., Festenstein, H., Morris, P.J. (Eds.): Histocompatibility Testing 1977, Munksgaard, Copenhagen 1978, S. 205-258

14. Belvedere, M., Richiardi, P., Savi, M., Curtoni, E.S., Carbonara, A.O., Cepellini, R.:
Appearance and Evolution of Anti-Da (B Cell-Specific) Antibodies after Planned Immunizations
Tissue Antigens 1978/11/153-162

15. Belvedere, M., Olivetti, E., Pellegrino, M.A., Ferrone, S.:
Reactivity of DR Xenoantisera in a Cytotoxic Test With Human Complement
Transplant Proc 1979/11/1327-1328

16. Belvedere, M., Richiardi, P., Borelli, I., Indiveri, F.:
Eteroantisieri anti linfociti B umani: Correllazione con allospecifità HLA-DR
Haematologica 1980/65/34-44

17. Bender, K.:
Das HLA-System
Biotest-Serum Institut GmbH, Frankfurt a.M., 1978

18. Bernoco, D., Bernoco, M., Cepellini, R., Poulik, M.D., van Leeuwen, A., van Rood, J.J.:
B Cell Antigens of the HLA System: A Simple Serotyping Technique Based on Non-Cytotoxic Anti-β^2-Microglobulin Reagents
Tissue Antigens 1976/8/253-260

19. Bodmer, J.G., Pickbourne, P., Richards, S.:
Ia Serology
in: Bodmer, W.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G., Festenstein, H., Morris, P.J. (Eds.): Histocompatibility Testing 1977, Munksgaard, Copenhagen 1978, S. 35-84

20. Bodmer, J.G.:
Summary and Conclusions
in: Bodmer, W.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G., Festenstein, H., Morris, P.J. (Eds.): Histocompatibility Testing 1977, Munksgaard, Copenhagen 1978, S. 351-357

21. Bodmer, J.G.:
Ia Antigens: Definition of the HLA-DRw Specificities
Br Med Bull 1978/34/233-240

22. Bodmer, W.F.:
The HLA-System: Introduction
Br Med Bull 1978/34/213-216

23. Bodmer, W.F., Bodmer, J.G.:
Evolution and Function of the HLA System
Br Med Bull 1978/34/309-316

24. Bodmer, W.F.:
Preface
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. XV-XVII

25. Borelli, I., Cornaglia, M., Olivetti, E., Curtoni, E.S.:
HLA-DR Typing: Some Relevant Difficulties
Transplant Proc 1979/11/1319-1320

26. Breuning, M.H., van den Berg-Loonen, E.M., Bernini, L.F., Bijlsma, J.B., van Loghem, E., Meera Khan, P., Nijenhuis, L.E.:
Localization of HLA on the Short Arm of Chromosome 6
Hum Genet 1977/37/131-139

27. Carpenter, C.B.:
HLA and Renal Transplantation
N Engl J Med 1980/302/860-862

28. Cohen-Miller, B., Gatti, R.A., Leibold, W.:
Comparison Between HLA-D (LCL) and DR Typing
Transplant Proc 1979/11/1795-1796

29. Cross, D.E., Coxe-Gilliland, R., Weaver, P.:
DRw Antigen Matching and B-Cell Antibody Crossmatching: Their Effect on Clinical Outcome of Renal Transplants
Transplant Proc 1979/11/1908-1910

30. Curtoni, E.S., Borelli, I., Carbonara, A.O., Diotallevi, P., Olivetti, L., Meri, T.A., Savi, M.:
Serologic and Genetic Aspects of HLA-DR Antigen Study
Transplant Proc 1979/11/1317-1318

31. Danilovs, J.A., Ayoub, G., Terasaki, P.I.:
B Lymphocyte Isolation by Thrombin-Nylon Wool
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing
1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles,
California 1980, S. 287-288

32. Dorval, G., Welsh, K.I., Nilsson, K., Wigzell, H.:
Quantitation of β_2-Microglobulin and HLA on the Surface
of Human Cells. I. T and B Lymphocytes and Lymphoblasts
Scand J Immunol 1977/6/255-263

33. Doxiadis, I., Wögeler, J., Jahnbowski, H.D., Grosse-Wilde, H.
Lymphocytotoxische Aktivität von HCL-Glycin-Eluaten aus
abgestoßenen Leichen-Nierentransplantaten
Vortrag auf der 13. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für
Histokompatibilitätstestung, Hannover, 8.-10. Okt. 1981

34. Drew, S.I., Nathanson, D.C., Danfirescu, P., Terasaki, P.I., Framarz Naiem, Billing, R.:
Serological Characterization of Human Monocytes for
HLA, B-Lymphocytes, Granulocyte and Monocyte-associated
Antigens by Cytotoxicity Testing
Tissue Antigens 1978/11/385-393

35. Duquesnoy, R.J., Marrari, M., Annen, K.:
Identification of an HLA-DR-Associated System of B-Cell Alloantigens
Transplant Proc 1979/11/1757-1760

36. Duquesnoy, R.J., Marrari, M.:
MB System
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 552-555

37. Engel, E., Guttmann, R.D., Fuks, A.:
Monoclonal Antibodies to Rat Major Histocompatibility Antigens
Transplant Proc 1981/13/1356-1359

38. Fathman, C.G., Cone, J.L., Sharrow, S.O., Tyrer, H., Sachs, D.H.:
Ia Alloantigen(s) Detected on Thymocytes by Use of a Fluorescence-Activated Cell Sorter
J Immunol 1975/115/584-587

39. Weigherty, C., Stastny, P.:
HLA-D Region-Associated Determinants Serve as Targets for Human Cell-Mediated Lysis
J Exp Med 1979/149/485-494

40. Floersheim, G.L., Storb, R.:
Knochenmarktransplantation bei aplastischen Anämien und akuten Leukämien
Schweiz Med Wochenschr 1974/104/3-10

41. DeJoey, S.R., Moore, D.E., Radue, ...:
The Use of Frozen-Thawed Lymphocytes for DRw Typing
Tissue Antigens 1980/16/387-392

42. Götze, D.:
The Major Histocompatibility System
in: Götze, D. (Ed.): The Major Histocompatibility System in Man and Animals, Springer Verlag 1977, 1-6

43. Grumet, F.C.:
HLA and Disease Associations
Transplant Proc 1977/9/1839-1844

44. Hardy, L., Suciu-Foca, N., McKiernan, T., Rohowsky, C., Bianci, J., Jacob, J., Pierce, J., Reemtsma, K.:
The Development and Specificity of Anti-T-Cell Antibodies During Humoral Rejection of Kidney Allografts
Transplant Proc 1979/11/389-392

45. Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, N.L., Firschein, I.L., Hashem, N.:
Immune Response and Mitosis of Human Peripheral Blood Lymphocytes in vitro
Science 1963/142/1185-1187

46. Huang, S.W., Suciu-Foca, N., Rubinstein, P.:
A New Technique for the Preparation of T Cells for Typing
Transplant Proc 1977/9/1715-1716

47. Hunter, S.W., Doulik, M.B.:
Turkey Anti-Human γ_2-microglobulin Reveals False Positive Reactions Observed with DR Antisera
Transplant Proc 1979/11/1966-1969

48. Indiveri, F., Wilson, B.S., Pellegrino, L.A., Ferrone, S.:
Detection of Human Histocompatibility (HLA) Antigens with an Indirect Rosette Microassay
J Immunol Methods 1979/29/101-109

49. Itakura, K.:
Structure of the HLA-D Region
Microbiol Immunol 1979/23/1135-1139

50. Jonsson, A.K., Hard, K.E., Amos, D.:
B-Lymphocyte Alloantigens
Scand J Immunol 1977/6/403-408

51. Juji, T., Maeda, H., Omori, K.:
MT 2
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, p. 565-566

52. Katz, D.H., Graves, M., Dorf, M.E., Dimuzio, M., Benacerraf, B.:
Cell Interaction Between Histoincompatible T and B Lymphocytes. VII. Cooperative Responses Between Lymphocytes Are Controlled by Genes in the I Region of the H-2 Complex
J Exp Med 1975/141/255-260

55. Kissmeyer-Nielsen, F. (Ed.):
B-Cell (or Ia) Typing
Tissue Antigens 1976/6/327-328

54. Kissmeyer-Nielsen, F., Kristensen, T.:
An Overview of the HLA System: Clinical Aspects
Transplant Proc 1977/9/1789-1794

55. Klareskog, L., Nask, L., Rohlman, J., Peterson, P.A.:
Heavy HLA-DR (Ia) Antigen Chain Is Controlled by the
MHC Region
Nature 1976/275/762-764

56. Klein, J.:
Evolution and Function of the Major Histocompatibility
System: Facts and Speculations
in: Götze, D. (Ed.): The Major Histocompatibility
System in Man and Animals, Springer Verlag 1977, 339-378

57. Köhler, G., Milstein, C.:
Continuous Culture of Fused Cells Secreting Antibody
of Predefined Specificity
Nature 1975/256/495-497

58. Köhler, G., Milstein, C.:
Derivation of Specific Antibody-Producing Tissue Culture
and Tumor Lines by Cell Fusion
Eur J Immunol 1976/6/511-519

59. Kuntz, B.M.E., Kuntz, R.M., Albert, E.D.:
Phagocytosis of Monocytes in Cancer Patients
Z Krebsforsch Klin Onkol 1978/91/11-17

60. van Leeuwen, A., Schuit, H.R.E., van Rood, J.J.:
Typing for MLC (LD): II. The Selection of Nonstimulator Cells by MLC Inhibition Test Using SD-Identical Stimulator Cells (MISIS) and Fluorescence Antibody Studies
Transplant Proc 1973/5/1539-1542

61. van Leeuwen, A., van Rood, J.J.:
Description of B Cell Methods
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 278-279

62. Lenhard, V.:
Wertigkeit immunologischer Faktoren bei der Nierentransplantation
Vortrag auf der 13. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Histokompatibilitätstestung, Hannover, 8.-10. Okt. 1981

63. Longo, A., Ferrara, G.B.:
Human T Cells - Separation and Typing
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 283-284

64. Luciani, G., Castagneto, M., Monari, C., Renna, E.:
Cytotoxic Antibodies to B Lymphocytes in Kidney Transplant Patients
Transplant Proc 1979/11/1265-1266

65. Madsen, M., Johnsen, H.E., Kissmeyer-Nielsen, F.:
HLA-DR Typing of Frozen B Lymphocytes
Transplant Proc 1979/11/1321

66. Madsen, M., Johnsen, H.E., Kissmeyer-Nielsen, F.:
Separation of Human T and B Lymphocytes Using AET-Treated Sheep Red Blood Cells
Transplant Proc 1979/11/1381-1382

67. Mann, D.L., Kaufmann, J., Orr, H., Robb, R., Strominger, J.:
Serologic and Structural Studies of DR-Related Antigens
Transplant Proc 1979/11/668-673

68. Mann, D.L., Sharrow, S.O.:
B-Cell Alloantigens on T Lymphocytes
Transplant Proc 1979/11/1774-1775

69. Markert, M.C., Cresswell, P.:
Polymorphism of Human B-Cell Alloantigens: Evidence for Three Loci within the HLA System
Proc Natl Acad Sci USA 1980/77/6101-6104

70. Mawas, C., Charmot, D., Comoy, A., Sasportes, M.:
A Rapid HLA-D Matching Method using PHA Blasts as Responding Cells (Preliminary Data on PHA Blasts HLA-D Typing)
Tissue Antigens 1976/6/121-129

71. Medawar, P.:
The Nobel Awards for Medicine or Physiology
Nature 1981/289/345

72. McMichael, A.J., Radvany, R.M., Payne, R.:
Rapid Preparation of B-Cell-Enriched Lymphocytes by Electrophoresis
Transplant Proc 1977/9,1 Supp 1/133-136

73. Mickey, M.R., Dausset, P.I., Kreisler, M., Albert, E.D., Senger, D.R.:
Analysis of Histocompatibility Data from 1000 Kidney Transplants
Tissue Antigens 1971/1/57-67

74. Morris, P.J., Batchelor, J.R., Festenstein, H.:
Matching for HLA in Transplantation
Br Med Bull 1978/34/259-262

75. Morris, P.J., Hay, J.:
The Crossmatch in Renal Transplantation
Tissue Antigens 1981/17/75-82

76. de Mouzon, A., Soulillou, J.P., Blanc, L., Durand, D., Chayon, D., Ducos, J.:
Anti-Donor's B Lymphocytes and Anti IgG Antibodies in Kidney Allograft Recipients: Correlative Study With the Transplant Outcome
Transplant Proc 1979/11/1267-1268

77. Müller, G.A., Müller, C., Wernet, P.:
Einfluß der MT-Spezifitäten auf die Transplantatprognose bei der Leichennierentransplantation
Vortrag auf der 13. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Histokompatibilitätstestung, Hannover, 8.-10. Okt. 1981

78. Mueller-Eckhardt, G., Mayr, W.R., Prel, L., Dapper, G., Mueller-Eckhardt, C.:
Kopplungsungleichgewicht der B14-Subtypen mit DR-Antigenen
Vortrag auf der 13. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Histokompatibilitätstestung, Hannover, 8.-10. Okt. 1981

79. Munro, A., Waldmann, H.:
The Major Histocompatibility System and the Immune Response
Br Med Bull 1978/34/253-258

80. Nakata, S., Park, M.S., Omori, K.:
MT 3
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 569

81. Nash, A.A.:
Separation of Lymphocyte Sub-Populations Using Antibodies Attached to Staphylococcal Protein A-Coated Surfaces
Immunol Methods 1978/12/149-161

82. O'Neill, G.J., Braun, D., Park, L.S., Dupont, B.:
HLA-Linked Genetic Markers in HLA Genotyped Families
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 142-147

83. Neuhaus, P., Borleffs, J.C.C., Marquet, R.L., Balner, H.:
Der Einfluß von Bluttransfusionen auf MLC-Reaktivität und Überlebenszeit nierentransplantierter Rhesusaffen
Vortrag auf der 13. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Histokompatibilitätstestung, Hannover, 8.-10. Okt. 1981

84. Oliver, R.T.D.:
HLA-D Locus and Susceptibility to Disease
Nature 1978/274/14-15

85. Opelz, G., Mickey, M.R., Terasaki, P.I.:
Identification of Unresponsive Kidney Transplantant Recipients
Lancet 1972/1/868

86. Opelz, G., Terasaki, P.I.:
Factors Influencing Effect of HLA Matching on Cadaver Kidney Transplants
Transplant Proc 1977/9/1795-1797

87. Opelz, G., Terasaki, P.I.:
International Histocompatibility Workshop Study on Renal Transplantation
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 592-624

88. Park, M.S., Terasaki, P.I., Saito, S., Opelz, G.:
Relation Between HLA-Dw and the B-Lymphocyte Specificities
Scand J Immunol 1977/6/413-418

89. Park, M.S., Terasaki, P.I., Byrns, G., Ayoub, G.:
Cold-Reactive Antibodies to B Lymphocytes and Their Absorption by Platelets and Red Cells
Transplant Proc 1977/9/1701-1703

90. Park, M.S., Terasaki, P.I.:
Second DR Locus
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 578-582

91. Park, M.S., Nakata, S., Terasaki, P.I.:
Selection of DR Sera for the Workshop
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 795-797

92. Park, M.S., Terasaki, P.I., Nakata, S., Aoki, D.:
Supertypic DR Groups: MT 1, MT 2, and MT 3
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing
1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles,
California 1980, S. 854-857

93. Persijn, G.G., van Hoof, J.P., Kalff, M.W., Lansbergen, Q.,
van Rood, J.J.:
Effect of Blood Transfusions and HLA Matching on Renal
Transplantation in the Netherlands
Transplant Proc 1977/9/503-505

94. Persijn, G.G., van Leeuwen, A., Hoogeboom, J., Gabb, B.W.,
Nagtegaal, A., van Rood, J.J.:
Matching for HLA Antigens of A, B, and DR Loci in Renal
Transplantation by Eurotransplant
Lancet 1978/1/1278-1281

95. Petrányi, G.G., Hollán, R.S.:
Joint Report from "HLA-DR Intertransplant Workshop 79"
Tissue Antigens 1980/16/1-22

96. Pierres, M., Rebouah, J.P., Kourilsky, F.M., Dosseto, M.,
Mercier, P., Mawas, C., Malissen, B.:
Cross-Reactions Between Mouse Ia and Human HLA-D/DR
Antigens Analyzed with Monoclonal Alloantibodies
J Immunol 1981/126/2424-2429

97. van Rood, J.J., van Leeuwen, A., Ploem, J.S.:
Simultaneous Detection of Two Cell Populations by Two Colour Fluorescence and Application to the Recognition of B Cell (Ia like) Determinants
Nature 1976/262/795-797

98. van Rood, J.J., van Leeuwen, A., Keuning, J.J., Termijtelen, A.:
Evidence for Two Series of B-Cell Antigens in Man and Their Comparison With HLA-D
Scand J Immunol 1977/6/373-384

99. van Rood, J.J., van Leeuwen, A., Persijn, G.G., Lansbergen, Q., Goulmy, E., Termijtelen, A., Bradley, B.A.:
HLA Compatibility in Clinical Transplantation
Transplant Proc 1977/9/459-467

100. Sachs, D.H.:
An Overview and Recent Findings on the Ia Antigens of the Major Histocompatibility Locus
J Reticuloendothel Soc 1979/26/581-586

101. Sasazuki, T., Kohno, Y., Iwamoto, I., Tanimura, I., Naito, S., Kashiwagi, N., Itakura, K., Aizawa, M., Hasegawa, T., Miyajima, T., Akiyama, N., Juji, T., Tsuji, K., Sekiguchi, S., Yoshida, T.O., Akaza, T., Matsuyama, M., Toyoda, K.:
Japanese Regional Report. The Relationship Between HLA-D and MIA Specificities in the Japanese Population
in: Bodmer, W.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G., Festenstein, H., Morris, P.J. (Eds.): Histocompatibility Testing 1977, Munksgaard, Copenhagen 1978, S. 489-498

102. Silver, J., Ferrone, S.:
Structural Organization of Human DR Antigens and Their Murine Analog, I-E Antigens: Serologic, Genetic and Functional Implications
Transplant Proc 1979/11/1743-1744

103. Slater, L.M., Murray, S., Liu, J., Hudelson, B.:
Dissimilar Effects of Ultraviolet Light on HLA-D and HLA-DR Antigens
Tissue Antigens 1980/15/431-435

104. Solheim, B.G., Flatmark, A., Enger, E., Jervell, J., Thorsby, E.:
Influence of HLA-A, -B,-C, and -D Matching on the Outcome of Clinical Kidney Transplantation
Transplant Proc 1977/9/475-478

105. Solheim, B.G., Juhs, A., Smith, L., Strominger, J.L., Thorsby, E.:
Possible Detection of HLA-DR Alloantigenetic Specificities in Man With Unabsorbed Rabbit Antisera
Scand J Immunol 1978/8/15-20

106. Stastny, P.:
Association of the B-cell alloantigen DRw 4 with Rheumatoid Arthritis
N Engl J Med 1978/298/869-871

107. Stastny, P.:
MLA-D in the Rheumatic Diseases
J Reticuloendothel Soc 1979/26/301-307

108. Stocker, J.W., Garotta, G., Lausmann, ..., Brusco, ..., Cepellini, R.:
Separation of Human Cells Bearing MLA-DR Antigens Using a Monoclonal Antibody Rosetting Method
Tissue Antigens 1979/13/212-222

109. Suciu-Foca, N., Godfrey, ..., Rohowsky, C., McKiernan, P., Susinno, E., Broell, J.:
Evidence That HLA-D is Different from DR and That Two Different HLA Loci Code for B-Cell Antigens
Transplant Proc 1979/11/1781-1787

110. Svejgaard, A.:
HLA and Autoimmune Diseases
Allergy 1979/34/275-281

111. Tait, B.D., D'Apice, A.J.F., Love, D.N.:
The MLR in Human Cadaveric Renal Transplantation
Tissue Antigens 1978/11/399-402

112. Terasaki, P.I., McClelland, J.D.:
Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins
Nature 1964/204/998-1000

113. Terasaki, P.I., Park, M.S., Opelz, G., Saito, S., Mickey, M.R.:
The Role of B-Lymphocyte Antigens in MLC Stimulation
Transplant Proc 1977/9/469-473

114. Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M.S., Ozturk, G., Iwaki, Y.:
Microdroplet Testing for HLA-A, -B, -C, and -D Antigens
Am J Clin Pathol 1978/69/103-120

115. Thompson, J.S., Goeken, N.E., Greazel, N.A., Rhoades, J.R., Severson, C.D.:
MB 1, MB 2, and MB 3 - Alternate Allelic Candidates for DRw Supratypic Antigens
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 858-859

116. Thomsen, M., Morling, N., Platz, P., Ryder, L.P., Svejgaard, A.:
HLA and disease
Transplant Proc 1979/11/633-637

117. Thorsby, E.:
The Human Major Histocompatibility Complex HLA: Some Recent Developments
Transplant Proc 1979/11/618-623

118. Ting, A.:
Ia and Transplantation
in: Bodmer, W.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G., Festenstein, H., Morris, P.J. (Eds.): Histocompatibility Testing 1977, Munksgaard, Copenhagen 1978, S. 328-332

119. Ting, A., Morris, P.J.:
Matching for B-Cell Antigens of the HLA-DR Series in Cadaver Renal Transplantation
Lancet 1978/1/575-577

120. Ting, A., Williams, L.A., Morris, P.J.:
Transplantation: Immunological Monitoring
Br Med Bull 1978/34/263-270

121. Ting, A., Morris, P.J.:
The Influence of HLA-DR Matching on Renal Transplant Outcome
Transplant Proc 1979/11/1295

122. Tosi, R., Tanigaki, N., Dentis, D., Ferrara, G.B., Pressman, D.:
Immunological Dissection of Human Ia Molecules
J Exp Med 1979/148/1592-1611

123. Tosi, R., Tanigaki, N.:
MT 1
in: Terasaki, P.I. (Ed.): Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California 1980, S. 558-563

124. Tsuji, K., Hose, Y., Komori, A., Tajika, A., Nakagawa, M., Inouye, H., Yamamura, M.:
Probable Existence of Four Subloci in the HLA-DR (or D) Region
Transplant Proc 1979/11/1792-1795

125. Winchester, R.J., Kunkel, H.G.:
The Human Ia System
Adv Immunol 1979/28/221-292

126. Zinmermann, R., Czer, H., De Wolf, W.C., Evans, R.L., Yunis, E.J., Schlossman, S.F.:
The Detection of Ia-Like and DRw Antigens on Activated T Cells
Transplant Proc 1979/11/1770-1773

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Brüster für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung.

Frau Dr. B. Kuntz danke ich für die hilfreiche Beratung sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen.

Weiterhin danke ich Herrn Swoboda und Herrn Lauber für ihre technische Hilfe.

L e b e n s l a u f

Am 22. März 1956 wurde ich, Peter Alexander Fricke, als Sohn des Kaufmanns Eberhard Fricke und seiner Ehefrau Dr. rer. pol. Ingeborg Fricke in Göttingen geboren.

Nach Durchlaufen der schulischen Ausbildung legte ich im Juni 1974 an der Graf-Engelbert-Schule in Bochum die Reifeprüfung ab.

Am 1. Juli 1974 trat ich in die Bundesmarine ein. Nach Ausbildung und Einsatz als Seeoffizier begann ich im Wintersemester 1976/77 als Sanitätsoffizieranwärter in Bochum das Medizinstudium. Nach der Ärztlichen Vorprüfung im August 1978 setzte ich mein Studium an der Universität Düsseldorf fort.

Zur Zeit befinde ich mich im Praktischen Jahr an den Krankenanstalten Neuss, Lukaskrankenhaus.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353